Manfred Geeren

Diss. München

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544309_0023

Aus der Anatomischen Anstalt
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. H. Frick

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR MORPHOLOGIE UND STEREOLOGIE VERSCHIEDENER SÄUGETIER-THROMBOZYTEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der

gesamten Medizin an der

Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Manfred Geeren

aus

Essen

Jahr

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. K.U. Benner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Wilmanns
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	27.3.1984

MEINER FRAU UND MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG 1

B. MATERIAL UND METHODEN 3

I. Untersuchte Spezies und Technik der Blutentnahme 3

II. Präparation der Blutproben 3

1. Herstellung von Thromboyztenpräparaten zur lichtmikroskopischen Vermessung 3

2. Herstellung von Thrombozytenpräparaten zur rasterelektronenmikroskopischen Vermessung 3

3. Herstellung von Thrombozytenpräparaten zur transmissionselektronenmikroskopischen Vermessung 4

4. Herstellung von Thrombozytenpräparaten zur elektronischen Volumenmessung 4

III. Das halbautomatische Bildanalysesystem 4

1. Meßprinzip 4

2. Prüfung der Meßgenauigkeit 5

IV. Anwendung des halbautomatischen Bildanalysesystems bzw. des elektronischen Zellvolumeters zur:

1. Vermessung lichtmikroskopisch vergrößerter Thrombozytenpräparate 5

2. Vermessung rasterelektronenmikroskopisch vergrößerter Thrombozytenpräparate 6

3. Vermessung transmissionselektronenmikroskopisch vergrößerter Thrombozytenpräparate 6

4. Elektronischen Volumenmessung 6

V. Stereologische Analyse der Thrombozyten 7

1. Auswahl der Präparate 7

2. Stereologische Berechnungen 7

VI. Statistische Auswertung 8

Seite

C. ERGEBNISSE 10

I. Bestimmung der Thrombozytengrößen 10

1. Vermessung lichtmikroskopisch vergrößerter Thrombozytenpräparate 10

2. Vermessung rasterelektronenmikroskopisch vergrößerter Thromboyztenpräparate 10

3. Vermessung transmissionselektronenmikroskopisch vergrößerter Thrombozytenpräparate 11

a. Gesamtthrombozytenfläche 11

b. Fläche der thrombozytären α-Granula 11

c. Fläche der thrombozytären Dense Bodies 11

d. Fläche der thrombozytären Mitochondrien 12

4. Elektronische Volumenmessung 12

II. Stereologische Analyse der Thrombozyten und ihrer Organellen 13

1. Berechnung von Oberflächen und Volumina der transmissionselektronenmikroskopisch vergrößerten Thrombozyten 13

2. Auswertung der an α-Granula erhobenen Daten 13

a. Volumendichte 13

b. Oberflächendichte 13

c. Numerische Dichte 14

3. Auswertung der an Dense Bodies erhobenen Daten 14

a. Volumendichte 14

b. Oberflächendichte 14

c. Numerische Dichte 15

4. Auswertung der an Mitochondrien erhobenen Daten 15

a. Volumendichte 15

Seite

b. Oberflächendichte 15

c. Numerische Dichte 16

D. DISKUSSION 17

I. Prüfung der Genauigkeit der benutzten Systeme 17

1. Halbautomatisches Bildanalysesystem 17

2. Elektronisches Zellvolumeter 17

II. Prinzipien der Histostereologie und ihre Anwendung auf Thrombozyten 18

III. Bestimmung der Thrombozytengrößen 19

1. Manuell-optisch erhobene Daten 19

2. Elektronische Volumenmessung 20

IV. Stereologische Analyse der Thrombozyten 22

E. ZUSAMMENFASSUNG 28

F. LITERATURHINWEISE 29

A. EINLEITUNG

Nachdem im Jahre 1882 Bizzozero (9) als erster eindeutig die eigenständige Rolle der Thrombozyten unter der zellulären Fraktion des Blutes erkannt, Eberth und Schimmelbusch (31), Morawitz (72) sowie Wright und Minot (113) deren Bedeutung für die Blutstillung und -gerinnung beschrieben hatten, bedurfte es immerhin rund weitere 35 Jahre bis sich die medizinische Forschung erneut des Stellenwertes der Blutplättchen bei physiologischen und pathopysiologischen Vorgängen in der Blutzirkulation bewußt wurde.

Versucht man, die Position der Thrombozyten innerhalb des Organismus aufgrund der bis heute bekannnten Mechanismen abzustecken, so zeigt sich, daß diese Zellen (wegen fehlenden Kernes histologisch eigentlich exakter Fragmente genannt) in die unterschiedlichsten Abläufe des Organismus integriert sind (Tab.I). So sollen die Thrombozyten neben ihrer Beteiligung an der Hämostase u.a. die Entstehung der Atherosklerose fördern (52), die Zellproliferation stimulieren (15), an Entzündungsprozessen mitwirken (76) sowie zur Phagozytose befähigt sein (3,81).

Bei dieser erstaunlichen Multifunktionalität verwundert es kaum, wenn Störungen des thrombozytären Systems entweder als Ursache oder als Epiphänomen einer ganzen Reihe von Erkrankungen erkannt wurden, die sich meist an den Gefäßen bzw. im Kreislauf manifestieren, wie z.B. Herzinfarkt (41), Angina pectoris (43) transiente ischämische Attacken (94), periphere arterielle Verschlußkrankheiten (20) sowie die Hyperbetalipoproteinämie (16), die v. Willebrand'sche Krankheit (87) und das sogen. 'Gray Platelet Syndrome' (84). Zweifelsohne sind, wie der Literaturauswahl bereits zu entnehmen ist, Thrombozyten mit einer pathophysiologischen Aktivitätssteigerung daran häufiger beteiligt als Blutplättchen mit einer angeborenen oder erworbenen Unterfunktion.

Einer Vielzahl von organischen und anorganischen Substanzen ist im Laufe der letzten Jahre die Fähigkeit zur Regulation der thrombozytären Hyperfunktion zugeschrieben worden. Meistens aber wurde die Wirksamkeit solcher Substanzen nur an Labortieren und dann in der Regel mit "normalen Blutplättchen" getestet. Daß aber diese schon von Spezies zu Spezies voneinander abweichende Funktionsmerkmale aufweisen, bestätigt eine ganze Anzahl publizierter vergleichender Studien (1,64,69,89,97); schlüssige Erklärungen für diese Befunde fehlten bisher.

Da sich sehr oft in der Biologie die Funktion einer Zelle in ihrem spezifischen Feinbau niederschlägt, dieser somit Rückschlüsse auf das besondere Zellverhalten gestattet, sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob die auffälligen Funktionsunterschiede der Blutplättchen mit zytomorphologischen Besonderheiten - Unterschieden in der Zellgröße bzw. in Zahl und Größe intrathrombozytärer Organellen - korrelieren.

Im Laufe der Studien, bei denen mit verschiedenen Techniken (manuell-optisch an licht-, raster- und transmissionselektronisch vergrößerten Präparaten; elektronisch) die Thrombozytengrößen bestimmt wurden, tauchte die Frage auf, inwieweit den Resultaten der heute in der klinischen Laborroutinediagnostik eingeführten elektronischen Zytovolumetrie vertraut werden darf.

Am Arbeitsplatz stand ein Tischrechner zur Verfügung, der an das manuell-optische Bildanalysesystem anschließbar war. Zur rationellen Erfassung der großen Zahl von Einzeldaten bei der Vermessung der Thrombozyten und ihrer Organellen war es wünschenswert, eine Software zu entwickeln, die es gestattete, die planimetrisch gewonnenen Resultate im on-line-Betrieb vom Mikrocomputer zu übernehmen und abzuspeichern. Darüberhinaus bot es sich an, das Computerprogramm so zu erweitern, daß aus den morphometrischen Primärdaten direkt ein Zugang zur Stereologie der Zellstrukturen geschaffen wurde.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Untersuchte Spezies und Technik der Blutentnahme

Zur Volumetrie unfixierter Blutplättchen wurde vom Menschen und neun weiteren Spezies (Tab. II) je 1 bis 3 ml Blut entnommen und direkt in Zentrifugenröhrchen aufgefangen, in denen 10 ml eines Gemisches aus Glutaraldehyd (1%) und Phosphatpuffer (pH 7,35) vorgelegt worden waren. Während der Entnahme wurde darauf geachtet, daß die Blutproben niemals in Kontakt mit fremden Oberflächen kamen, oder der Raumluft ausgesetzt waren, da sich bei früheren Studien (5) gezeigt hatte, daß die Blutplättchen nur auf diese Weise in einer weitgehend ungereizten Form stabilisiert werden konnten. Nach 60 min langer Fixation wurden die Proben bei 4000 x g für eine Dauer von 15 min zentrifugiert, der zellfreie Überstand vorsichtig dekantiert und durch ein Aliquot von aqua bidest. ersetzt. Anschließend wurden die Proben solange aufgerüttelt, bis die darin enthaltenen Zellen wieder einzeln suspendiert waren, erneut zentrifugiert und der Überstand mit frischem aqua bidest. ausgetauscht. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt, wobei stets sorgfältig darauf geachtet wurde, daß bei der Zentrifugation der sich auf den Erythrozyten ansiedelnde Thrombozytenrasen niemals direkt der Luft ausgesetzt war.

II. Präparation der Blutproben

1. Herstellung von Thrombozytenpräparaten zur lichtmikroskopischen (LM) Vermessung

Für die LM-Größenmessung fixierter Plättchen wurden von der nach § B.I. hergestellten Thrombozytenschicht in üblicher Weise Ausstrichpräparate auf Glasobjektträgern angefertigt, nach Pappenheim gefärbt und dann mit dem Lichtmikroskop (Planobjektiv 100fach mit Ölimmersion, Orthoplan, Fa. Leitz, Wetzlar; s. Abb. 3a) ausgemessen.

2. Herstellung von Thromboyztenpräparaten zur rasterelektronenmikroskopischen (REM) Vermessung

Zur Vorbereitung der Blutplättchen für die REM-Studien wurden die nach § B.1. entnommenen und fixierten Zellproben in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Amylazetat entwässert. Anschließend wurden die Präparate nach der Critical-Point-Methode getrocknet und in einer Spotter-Anlage mit Gold beschichtet. Die dieserart aufbereiteten Zellproben wurden unter stets gleichbleibenden Bedingungen (20 kV; Neigungswinkel 20 Grad) gerastert, (Rasterelektronenmikroskop Cambridge S4-10) dargestellt und fotografiert. Abb. 1 zeigt die repräsentative Aufnahme eines REM-vergrößerten Thrombozyten.

Tab. II: Art der untersuchten Säugetiere und Anzahl der pro Spezies als Blutspender dienenden Individuen sowie Ort der Blutentnahme.

	Spezies	Anzahl	Ort der Blutentnahme
1.	Hund	3	V. saphena lateralis
2.	Kaninchen	5	V. auricularis lateralis
3.	Katze	3	V. saphena lateralis
4.	Meerschweinchen	8	A. carotis communis
5.	Mensch	6	V. mediana cubiti
6.	Ratte	10	A. carotis communis
7.	Rhesusaffe	3	V. mediana basilica
8.	Schaf	5	V. jugularis externa
9.	Schwein	4	V. auricularis lateralis
10.	Ziege	5	V. jugularis externa

Abb. 1: Fotografien eines REM- (6.400fach) und eines TEM-vergrößerten (28.500fach) Humanthrombozyten. Auf der TEM-Aufnahme sind neben den spezifischen Speicherorganellen zum canaliculären System gehörende Vesikel zu erkennen, die, wie auch die REM-Aufnahme zeigt, an verschiedenen Stellen mit der Zelloberfläche in Verbindung stehen (Pfeile).

M = Mitochondrien

G = α-Granula

3. Herstellung von Thrombozytenpräparaten zur transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Vermessung

Zur Herstellung TEM-vergrößerter Meßvorlagen von Blutplättchen wurde eine von Stockinger et al. (92) angegebene Methode benutzt. 8,5 ml durch Venenpunktion oder -kanülierung entnommenen Blutes wurden mit einem Stabilisationsmedium versetzt, das aus EDTA (1,0 ml einer 1%igen Lösung in physiologischem NaCl), Glutaraldehyd (0,1 ml; 25%) und Cacodylatpuffer (0,1 mol/l; 0,4 ml; pH 7,2) bestand. Nach vorsichtigem Vermischen wurden die Blutproben zentrifugiert (4000 x g; 20 min), der zellfreie Plasma-Überstand dekantiert und die Zellsäule nach Überschichtung mit einer 5%igen Glutaraldehyd-Cacodylatpuffer-Lösung (0,1 mol/l;pH 7,2) für die Dauer von 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Thrombozyten- und Leukozyten-enthaltende Zellschicht von der darunter befindlichen Säule der roten Blutkörperchen abgehoben, in ca. 1mm große Blöcke zerteilt und in 5%iger Glutaraldehyd-Cacodylatpuffer-Lösung 1 Std bei Zimmertemperatur nachfixiert. Diese Zellblöckchen wurden in einem 0,1molaren Cacodylatpuffer mit SaccharoseZusatz (7,5 g/ml) gewaschen und darin etwa für 24 Std aufbewahrt. Vor ihrer Kunststoffeinbettung (Epon 812) wurden die Blöckchen nach der Methode von Caulfield in OsO_4 nachfixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Mit einem Mikrotom (Reichert-Ultramikrotom OmU2) wurden von den Präparaten Ultra-Dünnschnitte angefertigt, diese auf Goldnetze aufgebracht (Abstand 3mm) und mit Uranylazetat doppelkontrastiert. Diese Präparate wurden auf 2 Stufen (9.600- und 28.500fach) TEM-vergrößert (Philips EM-400) und abgelichtet. In Abb.2 sind solche Schnittpräparate (Vergr. 28.500fach) der Thrombozyten von Hund, Mensch, Schaf und Schwein wiedergegeben.

4. Herstellung von Thrombozytenpräparaten zur elektronischen (EM) Volumenmessung

Die Volumina der hergestellten Plättchenproben wurden zusätzlich noch mit Hilfe eines elektronischen Meßgerätes (Metricell®) bestimmt. Dazu wurden die Zellsäulen nach ihrem letzten Wasch- und Zentrifugationsprozeß erneut aufgerüttelt, bei 120 x g nochmals für die Dauer von 10 min zentrifugiert und von dem nun plättchenreichen Überstand 1 ml entnommen und in 10 ml einer 1,8%igen NaCl-Lösung überführt.

III. Das halbautomatische Bildanalysesystem

1. Meßprinzip

Die verschiedenen Präparate bzw. die von diesen angefertigten Fotografien wurden mit einem halbautomatischen Bildanalysesystem (MOP AM 02; Kontron GmbH; Eching) morphometriert, die Daten dann zur weiteren stereologischen und statistischen Verarbeitung mit einem an das MOP angeschlossenen Tischrechner (HP-9835; Hewlett-Packard; Frankfurt a. Main) abgespeichert. Abb. 3 zeigt den Aufbau der Meß- und Speichereinheit.

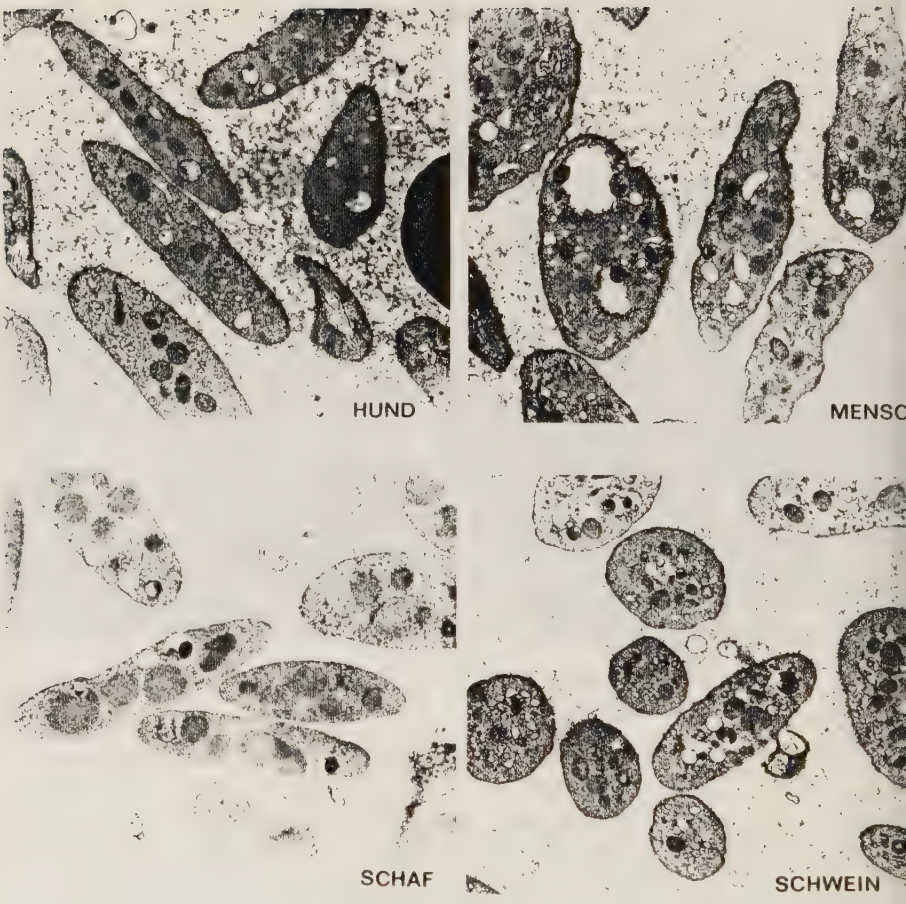


Abb. 2: Fotografien TEM-vergrößerter (28.500fach) Thrombozyten-schnittpräparate vom Hund, Mensch, Schaf und Schwein. Die Abbildung dokumentiert die unterschiedliche Größe der verschiedenen Granula innerhalb eines Thrombozyten, aber auch Unterschiede in der Größe eines Granulatyps zwischen den Plättchen der verschiedenen Spezies.

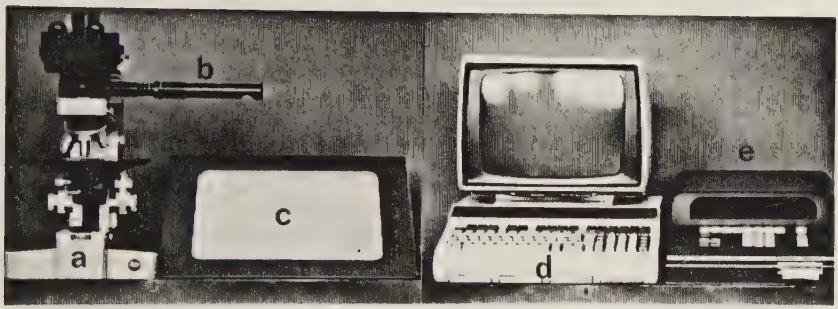


Abb. 3: Bestandteile des Datenerfassungs- und Speichersystems für die morphologischen und stereologischen Untersuchungen mit einem Mikroskop (a), einem Mikroprozessor (e) sowie einem an diesen angeschlossenen Tischrechner (d):

(a) Lichtmikroskop Orthoplan (Fa. Leitz, Wetzlar; Objektiv 100fach Ölimmersion).
(b) Zeicheneinrichtung mit Spiegel und Teilerwürfel (Fa. Leitz, Wetzlar).
(c) Auswertetablett angeschlossen an die Zentraleinheit (e).
(d) Mikrocomputer HP 9835 (Fa. Hewlett Packard, Frankfurt a. Main) mit 64 kByte Arbeitsspeicher und seriellem E/A-Interface V24.
(e) Zentraleinheit (MOP AM 02; Fa. Kontron, Eching), bestehend aus Z 80 ECB Mikrocomputerbaugruppen. Sie enthält einen 4 kByte RAM (Schreib/Lesespeicher) und einen 16 kByte PROM (Festwertspeicher).

Das Bildanalysesystem gestattete durch einmaliges Umfahren der zu messenden Struktur mit einem Abtaststift oder Cursor (Fadenkreuzlupe) die gleichzeitige Erfassung einer ganzen Reihe morphologischer Parameter, wie beispielsweise die Strukturfläche, den -umfang, den maximalen lageunabhängigen -durchmesser, die -feretdurchmesser (der Quotient aus den maximalen -durchmessern des Koordinatensystems), die -schwerpunktkoordinaten und den -formfaktor (Verhältnis von Fläche zu Umfang). Dazu mußte die Meßvorlage auf das zum MOP gehörende Spezialtablett (Abb. 3c) gelegt oder projiziert werden. Direkt unter der Glasscheibe des Tabletts befand sich ein Netzwerk magnetisierter Stahldrähte, die in Richtung der x- und y-Achse des Tabletts angeordnet waren. Die Drahtenden reichten an den Tablettseiten in Spulen, von denen Stromimpulse (sogen. magnetostriktive Pulse) entlang der Stahldrähte ausgesandt wurden, die in diesen zu geringfügigen Querschnittsveränderungen führten. Die Stromimpulse breiteten sich mit einer konstanten Geschwindigkeit von 5.000 m x s^{-1} entlang der Drähte aus. Nach Empfang der magnetostriktiven Pulse mit einer im Cursor befindlichen Spule wurde durch eine elektronische Kurzzeitmessung die wegproportionale Laufzeit und damit das Koordinatenpaar eines angetasteten Bildpunktes in absoluten mm-Werten bestimmt. In Bruchteilen von Sekunden wurden die Koordinatenwerte mit Hilfe eines nachgeschalteten Mikroprozessors (Abb. 3b) zu den oben erwähnten Bild- und Strukturparametern weiterverarbeitet.

2. Prüfung der Meßgenauigkeit

Da bei einer semiautomatischen, manuell-optischen Vermessung verschiedene Meßfehler bzw. -ungenauigkeiten von Seiten des Systems und des Untersuchers die Ergebnisse hätten beeinflussen können, wurde mit LM-vergrößerten Ausstrichpräparaten von Latexpartikeln (Fa. Dow Chemical; München) die Genauigkeit der Meßkette geprüft. Die mittleren Durchmesser dieser Kügelchen sollten laut Angabe des Herstellers 1,947 $\pm$ 0,0025, 2,35 $\pm$ 0,019 und 2,77 $\pm$ 0,14 µm betragen. Zunächst wurde eines der 2,35 µm großen Kügelchen fünfzigmal umfahren; das Meßsystem zeigte einen mittleren Durchmesser von 2,372 $\pm$ 0,024 µm an. Anschließend wurden je 100 Latexkügelchen der drei verschiedenen Chargen vermessen. Aus den Einzelwerten errechnete sich ein durchschnittlicher Durchmesser von 1,958 $\pm$0,09 µm für die kleinsten, 2,36 $\pm$ 0,08 µm für die mittleren und 2,821 $\pm$ 0,16 µm für die großen Partikel.

IV. Anwendung des halbautomatischen Bildanalysesystems bzw. des elektronischen Zellvolumeters

1. Vermessung lichtmikroskopisch vergrößerter Thrombozytenpräparate

Zur Morphometrie LM-vergrößerter Blutplättchen wurde das sogen. Mischbildverfahren verwendet. Dazu wurde über eine zwischen Okulartubus und Objektivträger eingesetzte Zeicheneinrichtung mit Spiegel und Teilerwürfel (Fa. Leitz, Wetzlar/Lahn; s. Abb. 3b) die beiden Abbildungen von mikroskopisch vergrößerten

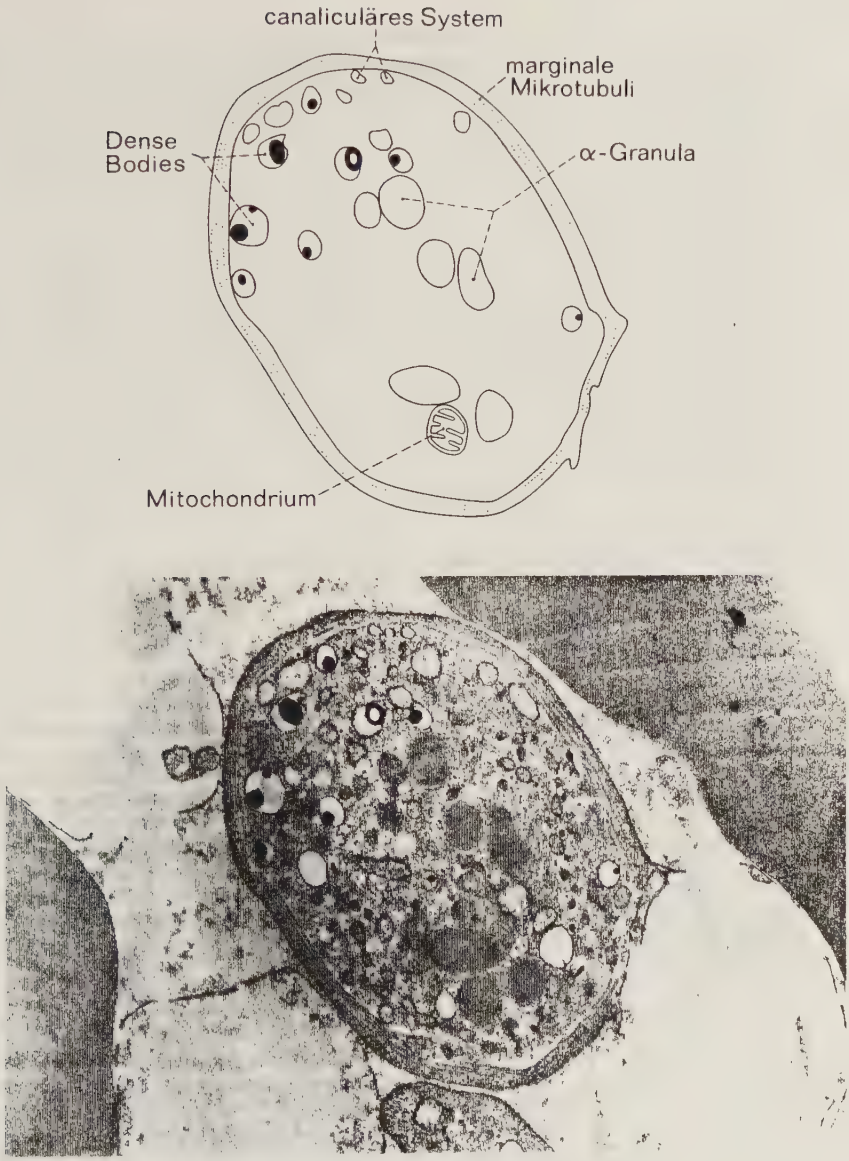


Abb. 4: Schematische Zeichnung eines Humanthrombozytenschnittes zur Erläuterung der intrazellulär vermessenen und stereologisch ausgewerteten Granula; in Anlehnung an ein 28.500fach vergrößertes, durch die Äquatorialebene getroffenes Schnittpräparat (unt. Bildhälfte).

Thrombozyten und Cursor-Leuchtdiode übereinander gespiegelt. Beim Einblick in das Okular sah man dann Thrombozytenausstrich und Lichtpunkt der Leuchtdiode gleichzeitig und konnte so die Zellgrenzen mit dem Cursor, der dabei dem Meßtablett auflag, umfahren.

2. Vermessung rasterelektronenmikroskopisch vergrößerter Thrombozytenpräparate

Die Negative von fotografischen Abbildungen REM-vergrößerter Präparate wurden mit einem Belichtungsautomat (Focomat V35; Fa. Leitz; Wetzlar/Lahn) auf das Meßtablett projiziert und dort die Randkonturen der Blutplättchen mit dem Cursor umfahren. Um trotz der diversen Vergrößerungsschritte (REM, Fotografie, Projektion) die Thrombozytenmaße in Absolutwerten angeben zu können, wurden als Maßstab wiederum zwei unterschiedliche große Chargen von Latexkügelchen (Dow Chemical, München; mittlere Durchmesser laut Herstellerangabe: 1,78 µm, 4,31 µm) vermessen, die für die REM-Darstellung mit Ausnahme der Fixation in identischer Weise behandelt worden waren wie die Blutplättchen (§ B.II.2.). Das Verhältnis von angegebenen zu ermittelten Durchmessern der Latexpartikel, aufgetragen in einem Koordinatensystem, lieferte eine Standard-Eichkurve. Von dieser konnten die realen Plättchendurchmesser abgelesen werden.

3. Vermessung transmissionselektronenmikroskopisch vergrößerter Thrombozytenpräparate

Die Fotografien TEM-vergrößerter Ultradünnschnitte der verschiedenen Blutplättchen (Abb. 2) wurden auf dem Meßtablett des MOP befestigt, so daß durch Umfahren der Thrombozytenschnittränder in einem Arbeitsgang Fläche, Umfang und maximaler Durchmesser der Zellstrukturen erfaßt werden konnten. Auf diese Weise wurden neben dem Gesamtthrombozytenanschnitt auch die darin befindlichen α-Granula, Dense Bodies (D.B.) und Mitochondrien morphometrisch ausgewertet. Abb. 4 markiert die im TEM-vergrößerten Zellpräparat sich unterschiedlich darstellenden thrombozytären Strukturen. Die optische Differenzierung der verschiedenen Thrombozytenorganellen erfolgte anhand der neusten, in diesem Zusammenhang relevanten Literatur (110).

4. Elektronische Volumenmessung

In einer letzten Versuchsserie wurde die Volumenverteilung der Thrombozyten der verschiedenen Mammalia elektronisch mit einer auf dem Coulter-Prinzip (21) basierenden Meßeinrichtung bestimmt. Dabei wurde eine Elektrolyt-Lösung, in der die fixierten Thrombozyten suspendiert waren, mit konstanter Geschwindigkeit durch das Orificium einer Meßkapillare gesogen. An zwei am Kapillareingang gegenüberliegenden Elektroden war eine konstante Spannung angelegt. Passierte nun ein Thrombozyt diese Stelle, verursachte er eine Spannungsänderung, deren Ausmaß proportional zum Thrombozytenvolumen war. Das in der vorliegenden Studie benutzte Volumeter (Metricell®; MPI für Biochemie; Martinsried) soll als Weiterentwickelung gegenüber üblichen elektronischen

Instrumenten gewisse Fehlerquellen ausschließen (53). Als Suspensionslösung für die fixierten Thrombozytenpräparate wurde eine doppelt-physiologische (1,8%) NaCl-Lösung mit einem Widerstand von 61,5 Ohm x µm bei 25°C ausgewählt. Die Volumenbestimmung erfolgte an einem zylindrischen Orificium mit einem Durchmesser von 33 um und einer Länge von 27 um bei einer Stromstärke von 300 uA und einem Sog von 0,2 kg/µm², bei einer Flußrate von 1.000 bis 1.500 Zellen x s⁻¹ und einer Temperatur von 23°C. Zum Größenvergleich wurden Latexpartikel (Fa. Dow Chemical; München) mit einem mittleren Durchmesser von 1,83 µm (entspr. einem Volumen von 3,2 µm³) unter identischen Bedingungen vermessen. Die Größenklassifizierung erfolgte durch Einordnung und Auszählung der unterschiedlich hohen Signale in verschiedenen Meßkanälen. Die Resultate dieser Bestimmungen wurden mit einem an das Metricell® angeschlossenen Punkt-Matrix-Printer in Form von Verteilungskurven ausgegeben. Außerdem wurde, jeweils bezogen auf etwa 10.000 Einzelpartikel, der sich daraus errechnende Mittelwert und Standardabweichung (S.D.) ausgedruckt. Durch Bezug auf den Meßkanal, in dem die Latexpartikel registriert wurden, ergab sich das wirkliche Thombozytenvolumen.

V. Stereologische Analyse der Thrombozyten

1. Auswahl der Thrombozytenpräparate

Von insgesamt 10 der nach § B.II.3. angefertigten Thrombozytenblöckchen wurden für jedes Individium pro untersuchter Spezies 5 Blöckchen zufällig ausgewählt. Von jedem der 5 Blöckchen wurden wiederum 10 Ultradünnschnitte und von diesen TEM-Aufnahmen angefertigt. Zwischen 17 und 40 einzelne Zellanschnitte wurden aus den Fotografien pro Spezies vermessen. Um auch die aus den TEM-vergrößerten Präparaten gewonnenen Thrombozytenmaße mit denjenigen aus den LM- und REM-Serien vergleichen zu können, wurden vorwiegend solche Schnitte zur Vermesssung ausgesucht, die in ihrer Medianebene senkrecht zur Äquatorialebene getroffen worden waren (Abb. 4).

2. Stereologische Berechnungen

Aus Fläche, Umfang der jeweils vermessenen thrombozytären Organellen und ihrer Anzahl pro Zellanschnitt wurden mit Hilfe des Mikrocomputers HP 9835 (s. Abb. 3d), der durch eine selbstentwickelte Software (Abb. 5) gesteuert war, die stereologischen sogen. Sekundärparameter Volumendichte (V_v), Oberflächendichte (S_v) und numerische Dichte (N_v) unter Verwendung der folgenden, von Weibel (101) angegebenen Formeln berechnet:

a) $$V_v = A_o / A_{plat}$$

wobei A_o die Summe aller pro Zellanschnitt vermessenen Organellenflächen und Aplat die Testfläche des betreffenden Gesamtblutplättchenschnitts repräsentiert. Als Testfläche - ein stets gleichgehaltenes Referenzsystem in der vorliegenden Studie - wurde immer ein Thrombozytenareal von 8,16 µm² gewählt, das bei 28.500facher Vergrößerung einer realen Thrombozytenfläche von 1

```
REM --) STEREOLOGY1 FILE "STEP60"
PRINT LIN(1),TAB(30);"<STEREOLOGIE>";LIN(2)
OPTION BASE 1
COM D(1,19000),X(1000),Yw(120)[10],Zw[10][10],Nv,Nwv,Nc,Nno,Nc[10],Nc,Ncbus,
REDIM D(Nv,Nc)
 DIM Xv(10),Y(10)
flg=0
DEG
    DIM A$[4]
    PRINT "Liste stereologischer Funktionen#"
    PRINT LIN(1)
 PRINT "fuer ebene Schnitte"
    PRINT "VV,SV,NV"
    PRINT LIN(1)
 PRINT "fuer Projektionen#"
    PRINT "SV,NV,VV"
    PRINT LIN(1)
 INPUT "DEZIMAL-Pkt. ?";I
    IF I<>0 THEN 100
 FIXED 0
    GOSUB Read
    N=A/B
    V=P/B
 PRINT "Ebene Schnitte oder Projektionen#"
 PRINT "SCHNITTE=1"
    INPUT "PROJEKTIONEN=0",C
    PRINT "PROJEKTIONEN=0",C
    IF C<>0 THEN GOTO 240
 PRINT "Mittelwert der Flaeche";N
    PRINT LIN(1)
    PRINT "Mittelwert des Umfanges";V
    PRINT LIN(1)
 N=(B-A*B/8)/(B-1)
    N=SQR(N)
    V=(2-P*P/8)/(B-1)
    V=SQR(V)
 PRINT "Std der Flaeche",N
    PRINT LIN(1)
    PRINT "Std des Umfanges";V
    PRINT LIN(1)
 N=1.96*N/SQR(B)
    V=1.96*V/SQR(B)
 PRINT "Std des Mittelwertes der Flaeche",N
    PRINT LIN(1)
    PRINT "Std des Umfanges",V
    PRINT LIN(1)
 N=(A-N*N)/(B-1)
    V=(2-V*V)/(B-1)
 N=SQR(N)
    V=SQR(V)
 PRINT "Std der Flaeche",N
    PRINT LIN(1)
    PRINT "Std des Umfanges",V
    PRINT LIN(1)
 N=1.96*N/SQR(B)
    V=1.96*V/SQR(B)
 PRINT "Std des Mittelwertes der Flaeche",N
    PRINT LIN(1)
    PRINT "Std des Umfanges",V
    PRINT LIN(1)
 GOTO 270
240 PRINT "Welche stereologische Schnittfunktion#"
    PRINT "Entweder alle=ALL, keine=NONE"
    INPUT "UEBER WIEVIE LIEGE",A$
    PRINT "UEBER WIEVIE LIEGE",A$
    PRINT LIN(1)
 IF C=0 THEN GOTO Proj
 IF NOT (UPC$(A$)="VV") THEN 610
    CALL Vv(N,V,B)
    GOTO 91
 IF NOT (UPC$(A$)="SV") THEN 640
    CALL Sv(N,V,P)
    GOTO 91
 IF NOT (UPC$(A$)="NV") THEN 670
    CALL Nv(N,V,B,P,E)
    GOTO 91
 IF UPC$(A$)="NONE" THEN GOTO Ende
 IF NOT (UPC$(A$)="ALL") THEN 710
    CALL Alla(N,V,B,P,E,C,D,I,Z,0)
    GOTO Ende
 GOTO False
Proj: IF UPC$(A$)="NONE" THEN GOTO Ende
 INPUT "thickness?",D
    PRINT "thickness?",D
    PRINT LIN(1)
    IF D<=0 THEN GOTO 730
 PRINT "standard error"
    INPUT "of thickness?",I
    PRINT "of thickness?",I
    PRINT LIN(1)
 IF NOT (UPC$(A$)="SV") THEN 840
    CALL Psv(N,V,B,D,I)
    GOTO 91
 IF NOT (UPC$(A$)="NV") THEN 870
    CALL Pnv(N,D,E,D,I)
    GOTO 91
 IF NOT (UPC$(A$)="VV") THEN 900
    CALL Pvv(A,V,B,E,D,I)
    GOTO 91
 IF NOT (UPC$(A$)="ALL") THEN 930
    CALL Pall(N,V,B,P,D,E,C,D,I,Z,0)
    GOTO Ende
 GOTO False
940 Read1:   PRINT "ERROR!"
950 Ende: PRINT "ENDE DIEREOLOGIE"
960  DISP "SELECT KEY"              ! All routines eventually end here
970  PAUSE
980  GOTO 930
990 False: PRINT "name not known!"
1000    PRINT "compare list!"
1010        PRINT LIN(1)
1020        GOTO 91
1030 Read1:X=P=B=V=N=M=D=A=Y=W=I=J=0
1040    PRINT "VARS                    NAME"
1050    PRINT LIN(1)
1060    FOR K=1 TO Nv
1070    PRINT K,Yw(K)
1080    NEXT K
1090    INPUT "GIB VARS DER FLAECHE",M
1100        PRINT "GIB VARS DER FLAECHE",M
1110        IF (M<1)+(M>Nv THEN GOTO 1090
1120        INPUT "GIB VARS DES UMFANGE",B
1130        PRINT "GIB VARS DES UMFANGE",B
1140        IF (B<1+B)>Nv THEN GOTO 1130
1150        INPUT "scanning area?",X
1160        PRINT "scanning area?",X
1170        IF X<=0 THEN GOTO 1150
1180        PRINT LIN(1)
1190    INPUT "linear length?",X(0)
1200        PRINT "linear length?",X(0)
1210        PRINT LIN(1)
1220        PRINT LIN(1)
1230        FOR K=1 TO No
1240        A=A+D(M,K)
1250        P=P+D(B,K)
1260        B=B+D(M,K)↑2
1270        Z=Z+D(B,K)↑2
1280        NEXT K
1290        B=No
1300        RETURN
1310 !
1320    SUB Vv(A,X,N)
1330        OPTION BASE 1
1340 Vv:PRINT "Vv=",A/X*100
1350        PRINT "delta=";100/X*N
1360        PRINT LIN(1)
1370        SUBEND !


1380    SUB Sv(X,B,P)
1390        OPTION BASE 1
1400 Sv:PRINT "Sv=",4*P/(P1*X)
1410        PRINT "delta=",400/(P1*X)
1420        PRINT LIN(1)
1430        SUBEND !


1440 SUB Nv(A,X,N,B,E,D)
1450    OPTION BASE 1
1460 Nv:INPUT "beta ?",D
1470    PRINT "beta ?",D
1480    G=SQR(X*3)/4
1490    PRINT "NV =",E/X*SQR(8/3/A)
1500    PRINT "delta =",(3*E*SQR(8/A)*N+8/3/(A*A))*G/(2*X+SQR(8/3/A))
1510    PRINT LIN(1)
1520    SUBEND !
1530 SUB Alla(A,N,V,B,P,D,E,C,D,I,Z,0)
1540 Alla: CALL Vv(A,X,N)
1550       CALL Sv(X,B,P)
1560       CALL Nv(X,D,E)
1570       CALL Psv(A,N,B,P)
1580       CALL Pnv(A,D,E,D)
1590       CALL Pvv(A,X,N,B,P)
1600       CALL Pall(N,V,B,P,D,E)
1610       CALL Nv(A,X,N,B,E,0)
1620       SUBEND
1630 SUB Psv(A,N,B,E,D,I)
1640    OPTION BASE 1
1650 Psv: PRINT "mean inter-"
1660       INPUT "cept length ?",C
1670       PRINT "cept length ?",C
1680       PRINT "SV =",100*C*A/(X*D)
1690       PRINT "delta =",100*SQR(N/D+B*I^2/(D*D))/X
1700       PRINT LIN(1)
1710       SUBEND !
1720 SUB Pall(A,X,N,B,P,D,E,C,D,I,Z,0)
1730 Pall: CALL Psv(X,B,P,D,I)
1740       CALL Pnv(A,X,N,D,I)
1750       CALL Pvv(N,B,E,D,I)
1760       CALL Phi(B,P)
1770       CALL Pvv(A,X,N,C,D,I)
1780       SUBEND !
1790 SUB Clear(X)
1800    OPTION BASE 1
1810 Clear: FOR C=1 TO 10
1820         X(C)=0
1830         NEXT C
1840         SUBEND !
```

Abb. 5: Programm zur Steuerung des Mikrocomputers (in HP-Basic-Language) für die stereologische Berechnung morphometrierter Zellstrukturen.

μm^2 bzw. nach den für die Stereologie grundlegenden Delesse-Prinzip (32) einem Thrombozytenvolumen von 1 μm^3 entsprach,

b) $$S_V = (B_A \times 4)/\pi,$$

wobei B_A die Summe der Umfänge aller Organellen pro Testfläche angibt, und

c) $$N_V = (K/\beta) \times ((N_A^{3/2}) / (V_V^{1/2})),$$

wobei N_A für die Zahl aller vermessenen Organellen steht; der Koeffizient β bezieht sich auf die Organellenform. Die für die vorliegenden Untersuchungen ausgewählten Organellen gelten üblicherweise als sphärische Partikel (101), mit anderen Worten β entspricht $6/\pi$. Der Koeffizient K steht für die Größenverteilung der Organellen; nach Weibel et al. (102) liegt K für biologische Objekte zwischen 1,0 und 1,1. Das erwähnte Microcomputer-Programm zur Berechnung der stereologischen Parameter (Abb. 5) berücksichtigte die von Weibel (101) aufgestellten Formeln.

Zur Berechnung der Volumina (V_{plat}) und Oberflächen (S_{plat}) der Gesamtthrombozyten wurde als geometrisches Modell ein Rotationsellipsoid angenommen:

d) $$V_{plat} = (4/3)\pi \times (L_1/2)^2 \times (L_q/2) = (\pi/6) \times L_q \times L_1^2$$

e) $$S_{plat} = (\pi/2) \times L_1^2 + (\pi/4) \times L_q^2 \times ((L_1 + L_q) / (L_1 - L_q)) \times \log(L_1/L_q),$$

wobei L_1 den Längs- und L_q den Querdurchmesser symbolisiert.

5. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Will man die vorliegenden morphometrischen und stereologischen Resultate mit Hilfe einer sogen. verteilungsunabhängigen Prüfmethode statistisch vergleichen, so muß vorausgesetzt sein, daß die Prüfpaare derselben Grundgesamtheit angehören (85); weiterhin müssen die Grundgesamtheiten - zumindest angenähert - normalverteilt sein. Zunächst wurden die Resultate der vorliegenden Untersuchungen unter Verwendung des 'Vergleichtests zweier unabhängiger Stichproben nach Kolmogoroff und Smirnoff' daraufhin geprüft, ob sie aus derselben Grundgesamtheit stammten. Die Nullhypothese, nämlich, daß die Grundgesamtheiten der zu prüfenden Meßpaare gleich waren (unter Zugrundelegung eines 5%igen Signifikanzniveaus), konnte damit nicht angezweifelt werden. Mit dem Test auf Chi-Quadrat-Verteilung (ebenfalls bei einer 95%igen Vertrauensgrenze) konnte eine Normalverteilung der Meßpaare nachgewiesen und mit dem 'Kolmogoroff-Smirnoff-Test für die Güte der Anpassung' eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung nicht gefunden werden. Daher wurde der 't-Test für zwei unabhängige Beobachtungen' zur Prüfung signifikanter morphologisch oder stereologisch nachweisbarer Differenzen zwischen den Blutplättchen der verschiedenen Spezies benutzt. Als Vertrauens-

grenze bei diesem Test wurde ebenfalls ein 5%iges Signifikanzniveau angenommen.

C. ERGEBNISSE

I. Bestimmung der Thrombozytengrößen

1. Vermessung lichtmikroskopisch vergrößerter Thrombozytenpräparate

In einer ersten Versuchsserie wurden Ausstrichpräparate von Blutplättchen der verschiedenen Mammalia lichtmikroskopisch planimetriert. Die Ergebnisse dieser Durchmesser-, Flächen- und Umfangbestimmungen lassen sich, wie Tab. III dokumentiert, in zwei Gruppen aufteilen.

Mit einem mittleren maximalen Durchmesser (Dmax) von 2,73 ± 0,35 µm, einer durchnittlichen Fläche (F) von 5,60 ± 1,36 µm² und einem mittleren Umfang (U) von 8,59 ± 1,04 µm besaß der Mensch die größten Plättchen, gefolgt von denen des Rhesusaffen (Dmax: 2,71 ± 0,52 µm, F: 5,70 ± 1,26 µm², U: 8,87 ± 1,65 µm), des Meerschweinchens (Dmax: 2,70 ± 0,42 µm, F: 5,57 ± 1,60 µm², U: 8,57 ± 1,27 µm), des Schweins (Dmax: 2,67 ± 0,46 µm, F: 4,74 ± 1,54 µm², U: 8,01 ± 1,23 µm) und der Katze (Dmax: 2,66 ± 0,42 µm, F: 4,81 ± 1,27 µm², U: 8,04 ± 1,12 µm). Einer zweiten Gruppe mit signifikant ($p<0,05$) kleineren Zellen gehörten die Thrombozyten von Hund (Dmax: 2,47 ± 0,32 µm, F: 4,52 ± 1,21 µm², U: 7,87 ± 1,08 µm), die Ratte (Dmax: 2,31 ± 0,33 µm, F: 3,61 ± 1,36 µm², U: 7,03 ± 1,26 µm), das Kaninchen (Dmax: 2,26 ± 0,35 µm, F: 3,78 ± 1,15 µm², U: 7,07 ± 1,06 µm), das Schaf (Dmax: 2,15 ± 0,37 µm, F: 3,27 ± 1,05 µm², U: 6,61 ± 1,15 µm) und Ziege (Dmax: 1,85 ± 0,28, F: 2,35 ± 0,85 µm², U: 5,62 ± 0,90 µm) an.

2. Vermessung rasterelektronenmikroskopisch vergrößerter Thrombozytenpräparate

Bei den Vermessungen der REM-Präparate (Tab. IV) fand sich in etwa die schon bei der Auswertung der LM-Präparate aufgestellte Größenrangfolge. Wiederum waren die Meerschweinchen- und Humanplättchen mit einem mittleren Dmax von 2,23 ± 0,34 µm und 2,20 ± 0,28 µm, einer durchschnittlichen F von 3,87 ± 0,98 µm² und 3,80 ± 0,88 µm² und einem mittleren U von 7,20 ± 0,97 µm und 7,06 ± 0,84 µm die größten Zellen. Die Thrombozyten von Katze (Dmax: 2,13 ± 0,44 µm, F:3,30 ± 1,16 µm², U: 7,52 ± 1,24 µm), Rhesusaffe (Dmax: 2,12 ± 0,34 µm, F: 3,36 ± 0,83 µm², U: 6,74 ± 0,93 µm), Schwein (Dmax: 2,08 ± 0,34 µm, F: 3,29 ± 0,86 µm², U: 6,61 ± 0,90 µm) und Hund (Dmax: 2,08 ± 0,26 µm, F: 3,60 ± 0,75 µm², U: 6,97 ± 0,79 µm) waren statistisch signifikant kleiner ($p<0,05$). Von diesen setzten sich nochmals die Größendaten der Thrombozyten von Kaninchen (Dmax: 1,87 ± 0,40 µm, F: 2,42 ± 0,76 µm², U: 6,01 ± 1,14 µm) und der Ratte (Dmax: 1,84 ± 0,25 µm², F: 2,81 ± 0,71, U: 6,15 ± 0,82 µm) ab. Die Schafs- (Dmax: 1,59 ± 0,20 µm, F: 2,07 ± 0,50 µm², U: 5,21 ± 0,66 µm) und Ziegenplättchen (Dmax: 1,36 ± 0,18 µm, F: 1,48 ± 0,40 µm², U: 4,38 ± 0,58 µm) waren die signifikant ($p<0,05$) kleinsten der auf diese Weise vermessenen Zellen. Insgesamt lagen die Dmax-, F- und U-Werte der REM-Präparate um ca. 25% unter denjenigen der LM-Präparate.

Tab.III: Ergebnisse der Planimetrie lichtmikroskopisch-vergrößerter, mit Glutaraldehyd fixierter Thrombozyten von verschiedenen Säugetieren.

	Spezies	Dmax (µm)	Fläche (μm^2)	Umfang (µm)
1.	Hund	2,47 ± 0,30	4,52 ± 1,21	7,87 ± 1,08
2.	Kaninchen	2,26 ± 0,35	3,78 ± 1,15	7,07 ± 1,06
3.	Katze	2,66 ± 0,42	4,81 ± 1,27	8,04 ± 1,12
4.	Meerschweinchen	2,70 ± 0,42	5,57 ± 1,60	8,57 ± 1,27
5.	Mensch	2,73 ± 0,35	5,60 ± 1,36	8,59 ± 1,04
6.	Ratte	2,34 ± 0,45	3,61 ± 1,36	7,03 ± 1,26
7.	Rhesusaffe	2,71 ± 0,52	5,70 ± 1,26	8,57 ± 1,65
8.	Schaf	2,15 ± 0,37	3,27 ± 1,05	6,61 ± 1,15
9.	Schwein	2,67 ± 0,46	4,74 ± 1,54	8,01 + 1,23
10.	Ziege	1,85 + 0,28	2,35 ± 0,85	5,62 + 0,90

Tab. IV: Ergebnisse der Planimetrie rasterelektronenmikroskopisch-vergrößerter, mit Glutaraldehyd fixierter Thrombozyten von verschiedenen Säugetieren.

	Spezies	Dmax (µm)	Fläche (μm^2)	Umfang (µm)
1.	Hund	2,08 ± 0,26	3,60 ± 0,75	6,97 ± 0,79
2.	Kaninchen	1,87 ± 0,40	2,42 ± 0,76	6,01 ± 1,14
3.	Katze	2,13 ± 0,44	3,30 ± 1,16	7,52 ± 1,24
4.	Meerschweinchen	2,23 ± 0,34	3,87 ± 0,98	7,20 ± 0,97
5.	Mensch	2,20 ± 0,28	3,80 ± 0,88	7,06 ± 0,84
6.	Ratte	1,84 ± 0,25	2,81 ± 0,71	6,15 ± 0,82
7.	Rhesusaffe	2,12 ± 0,34	3,36 ± 0,83	6,74 ± 0,93
8.	Schaf	1,59 ± 0,20	2,07 ± 0,50	5,21 ± 0,66
9.	Schwein	2,08 ± 0,34	3,29 ± 0,86	6,61 ± 0,90
10.	Ziege	1,36 ± 0,18	1,48 ± 0,40	4,38 ± 0,58

3. Vermessung transmissionselektronenmikroskopisch vergrößerter Thrombozytenpräparate

a. Gesamtthrombozytenfläche

In Tab. V sind die Resultate der Flächenmessungen an TEM-vergrößerten Schnittpräparaten weitgehend ungereizter Thrombozyten der zehn diversen Mammalia aufgeführt. Tab. V gibt ebenfalls die mittleren Oberflächen und Volumina für die entsprechenden Thrombozyten wieder, die aus den morphometrischen Daten errechnet worden waren (§ C.II.1).

Danach waren die Katzenthrombozyten mit einer durchschnittlichen Fläche von 4,73 ± 1,99 μm^2 deutlich größer als diejenigen des Kaninchens (3,78 ± 2,05 μm^2), des Menschen (3,67 ± 1,25 μm^2), des Rhesusaffen (3,61 ± 1.32 μm^2), des Schweins (3,43 ± 1,65 μm^2) des Hundes (3,37 ± 1,18 μm^2), der Ratte (2,96 ± 1,21 μm^2) und des Schafs (2,84 ± 1,61 μm^2). Auch hier gehörten die Ziegenthrombozyten (2,34 ± 0.58 μm^2) wieder zu den kleinsten der vermessenen Zellen und wurden nur noch von den Meerschweinchenplättchen (2,30 ± 1,03 μm^2) unterboten.

Ein Vergleich der gefundenen Flächen, die an LM-, REM- und TEM-Präparaten bestimmt worden waren (Tab. III, IV, V), zeigte, daß bei weitgehender Übereinstimmung in der Größenfolge (lediglich die Werte für das Meerschweinchen fielen bei der TEM-Serie etwas aus der Reihe), die Thrombozytenflächen bei REM- sowie TEM-Vergrößerung gegenüber den Vergleichswerten der LM-Präparate um ca. 25% um kleiner waren.

b. Fläche der thrombozytären α-Granula

Auch bei Bestimmung der mittleren Flächen eines thrombozytären α-Granulums offenbarten sich zwischen den verschiedenen Spezies bestehende markante Unterschiede (Abb. 6 ; quergestreifte Säulen). Ziegen- und Schafsthrombozyten enthielten Granula, die mit im Durchschnitt 0,142 ± 0,06 μm^2 bzw. 0,119 ± 0,04 μm^2 signifikant ($p<0,05$) größer waren, als diejenigen des Kaninchens (0,74 ± 0,018 μm^2), der Katze (0,074 ± 0,018 μm^2), des Schweins (0,065 ± 0,019 μm^2), der Ratte (0,060 ± 0,022 μm^2) und des Rhesusaffen (0,00,054 ± 0,023 μm^2) ($p<0,05$). Die kleinsten α-Granula fanden sich in den Plättchen vom Menschen (0,047 ± 0,010 μm^2) und vom Hund (0,044 ± 0,015 μm^2). Der Unterschied zwischen diesen beiden und der vorher aufgeführten Gruppe war nochmals statistisch signifikant ($p<0,05$).

c. Fläche der thrombozytären Dense Bodies

In Abb. 6 sind in Form eines Säulendiagramms neben den mittleren Flächen der α-Granula (quergestreifte Säulen) diejenigen der D.B. (gepunktete Säulen), die in den Thrombozyten der verschiedenen Mammalia gemessen wurden, aufgetragen. Abermals enthielten Ziegen- (0,064 ± 0,045 μm^2) und Schafsthrombozyten (0,064 ± 0,042 μm^2) die größten D.B.; nur unwesentlich kleiner waren die D.B. der Hundeplättchen (0,053 ± 0,045 μm^2), während

Tab. V: Ergebnisse von Flächenmessungen, Volumen- und Oberflächenberechungen transmissionselektronenmikroskopisch-vergrößerter Thrombozyten von verschiedenen Säugetieren.

	Spezies	Fläche (μm^2)	Volumen (μm^3)	Oberfläche (μm^2)
1.	Hund	3,37 ± 1,18	7,21	20,78
2.	Kaninchen	3,78 ± 2,05	7,79	21,78
3.	Katze	4,73 ± 1,99	12,20	21,70
4.	Meerschweinchen	2,30 ± 1,03	5,17	20,35
5.	Mensch	3,67 ± 1,25	5,72	14,61
6.	Ratte	2,96 ± 1,21	4,68	17,54
7.	Rhesusaffe	3,61 ± 1,32	7,03	14,86
8.	Schaf	2,84 ± 1,61	3,88	12,02
9.	Schwein	3,43 ± 1,65	7,41	20,28
10.	Ziege	2,34 ± 0,58	3,34	10,66

sich hiervon diejenigen der Katze (0,040 ± 0,019 μm^2), der Ratte (0,035 ± 0,026 μm^2) und des Menschen (0,032 ± 0,023 μm^2) signifikant ($p<0,05$) absetzten. Die flächenmäßig kleinsten D.B. waren in den Thrombozyten des Kaninchens (0,029 ± 0,016 μm^2), des Rhesusaffen (0,025 ± 0,013 μm^2), des Schweins (0,025 ± 0,013 μm^2) und des Meerschweinchens (0,020 ± 0,013 μm^2) lokalisiert. Insgesamt waren die D.B. nur etwa halb so groß wie die α-Granula.

d. Fläche der thrombozytären Mitochondrien

Abb. 6 zeigt ebenfalls die Resultate der vergleichenden Mitochondrienvermessung (längsschraffierte Säulen); wie schon bei den α-Granula und D.B., so besaßen auch hier die Ziegenthrombozyten wieder mit im Mittel 0,65 ± 0,056 μm^2 die größten Mitochondrien, dicht gefolgt von denjenigen der Ratte (0,060 ± 0,035 μm^2), des Hundes (0,059 ± 0,030 μm^2), des Schweins (0,057 ± 0,033 μm^2), der Katze (0,053 ± 0,0352 μm^2) und des Schafs (0,051 ± 0,047 μm^2). Statistisch signifikant kleiner ($p<0,05$) als diese erwiesen sich die thrombozytären Mitochondrien beim Rhesusaffen (0,037 ± 0,026 μm^2), beim Menschen (0,035 ± 0,023 μm^2), beim Meerschweinchen (0,035 ± 0,020 μm^2) und beim Kaninchen (0,029 ± 0,033 μm^2). Ebenso, wie für die D.B. oben schon festgestellt, beträgt die mittlere Mitochondrienfläche bei allen Spezies ungefähr nur 50% der durchschnittlichen Fläche der α-Granula.

4. Elektronische Volumenmessung

Die Abb. 7, 8 und 9 zeigen die Originalkurven der elektronischen Volumenanalysen an Thrombozytenproben der verschiedenen Mammalia. Im rechten unteren Bildquadranten sind jedesmal die Verteilungskurven der Latexkügelchen, die zur Eichung des Meßsystems verwendet wurden, abgebildet. Die Messungen erfolgten bei drei verschiedenen Stromstärken: 150, 300 und 600 μA.

Tab. VI läßt erkennen, daß die Rattenplättchen im Durchschnitt das mit Abstand größte Volumen bzw. den sich von diesem ableitenden größten Dmax-Wert (6,49 ± 1,05 μm^3 bzw. 2,31 μm) aufwiesen. Darauf folgten die Thrombozyten des Rhesusaffen (4,17 ± 0,84 μm^3 bzw. 2,00 μm), des Hundes (4,16 ± 1,12 μm^3 bzw. 2,00 μm), des Meerschweinchens (3,79 ± 0,95 μm^3 bzw. 1,93 μm), des Menschen (3,55 ± 0,71 μm^3 bzw. 1,89 μm) und des Kaninchens (3,43 ± μm^3 bzw. 1,87 μm). Im unteren Bereich dieser Größenfolge rangierten die Blutplättchen der Katze (2,89 ± 0,60 μm^3 bzw. 1,77 μm), die jedoch immer noch signifikant größer waren als diejenigen der Ziege (Volumen: 1,69 ± 0,36 μm^3, Dmax: 1,48 μm) oder des Schafs (Volumen: 1,63 ± 0,38 μm^3, Dmax: 1,46 μm). Bei allen Messungen wurde eine für die elektronische Zellvolumetrie nach den Angaben von Thom et al. (95) typische rechtsgipfelige Verteilungskurve gefunden.

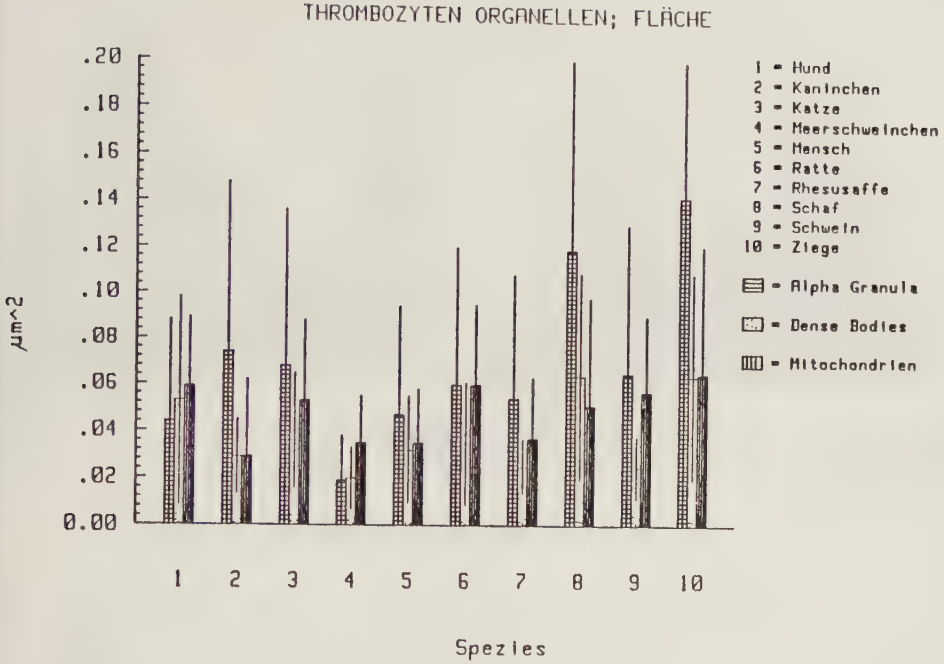
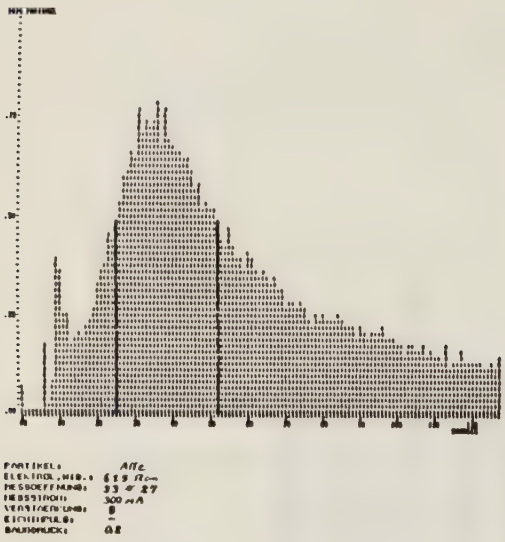
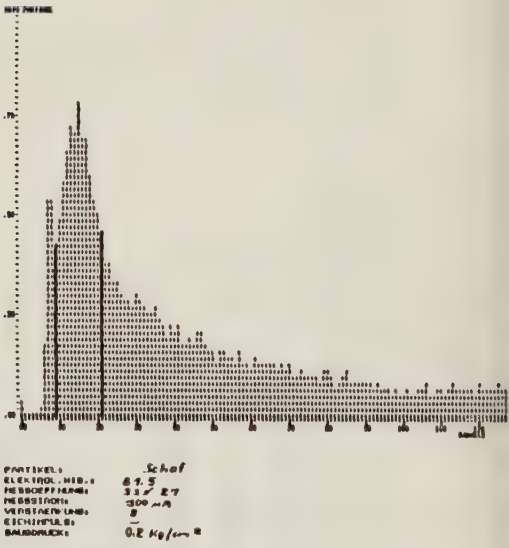
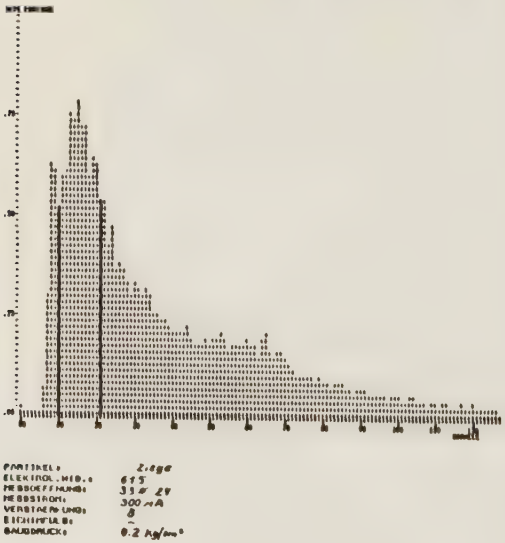


Abb. 6: Ergebnisse der Gesamtflächenbestimmung intrazellulärer Organellen (α-Granula; Dense Bodies; Mitochondrien) transmissionselektronenmikroskopisch-vergrößerter Präparate von Thrombozyten verschiedener Säugetiere (Mittelwerte und S.D.).







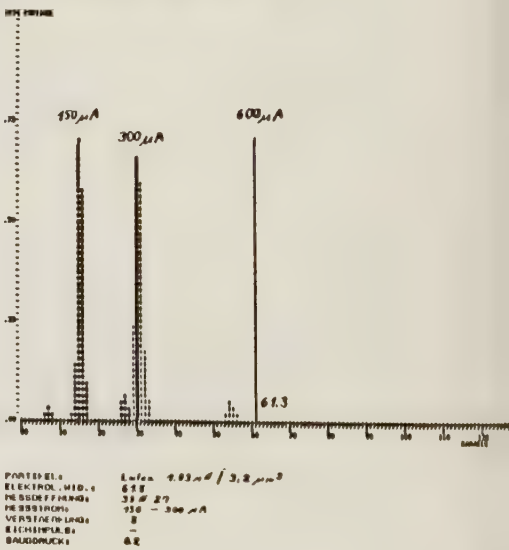


Abb. 7: Ergebnisse elektronischer Volumetrie mit den Thrombozyten von Affe, Schaf und Ziege. Die Messungen erfolgten bei einer Stromstärke von 300 µA. Als Referenzsystem wurden Latexpartikel mit einem mittleren Durchmesser von 1,83 µm gemessen.

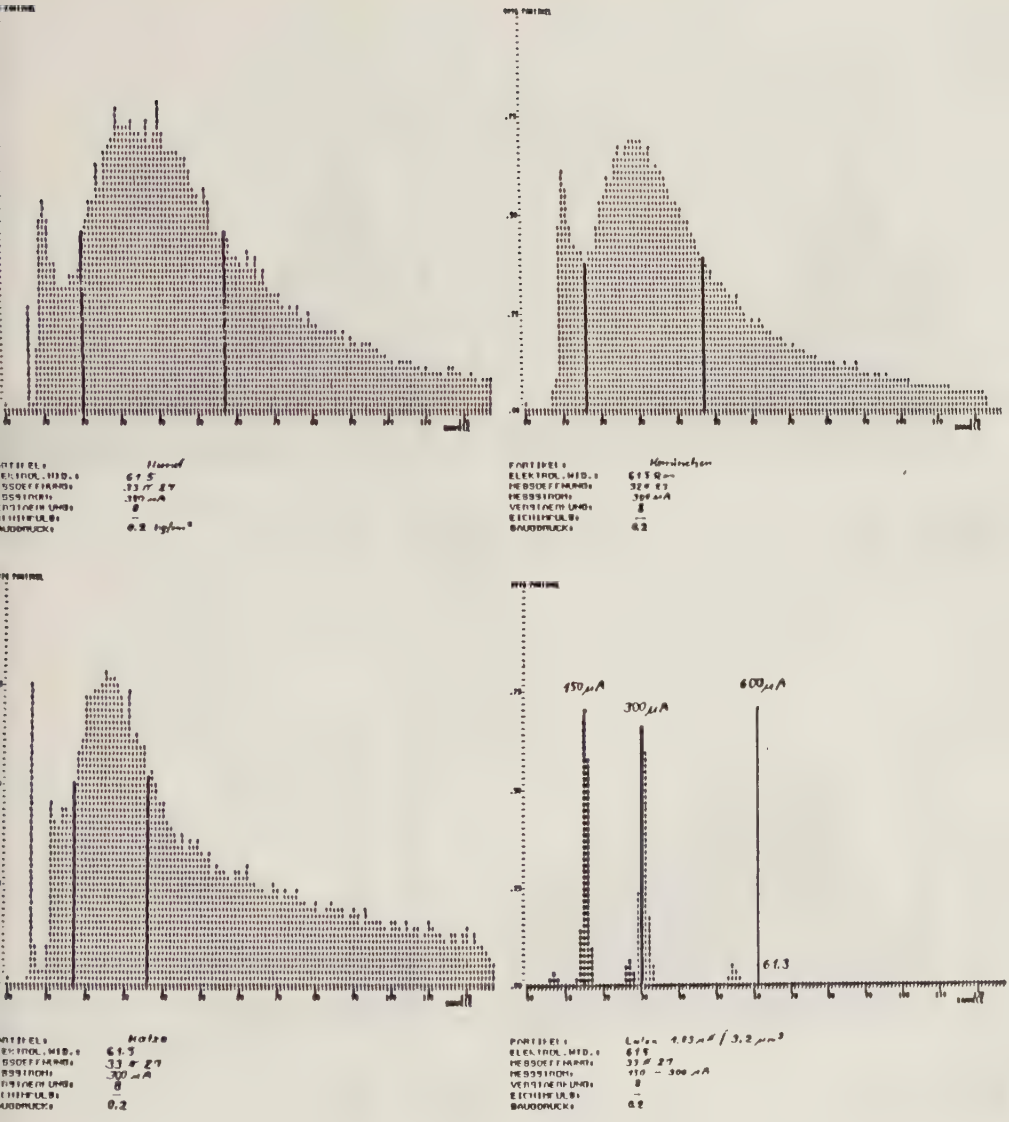
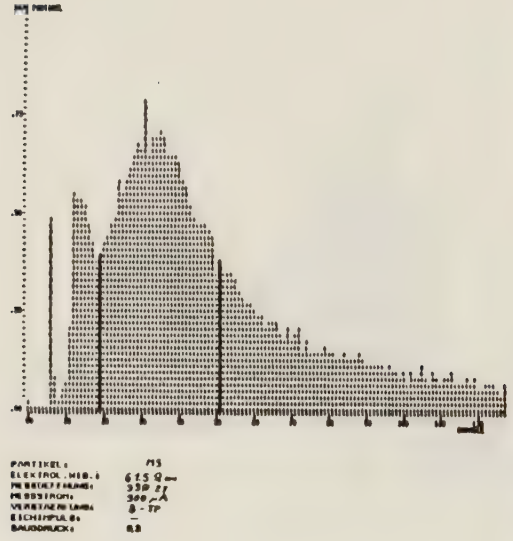
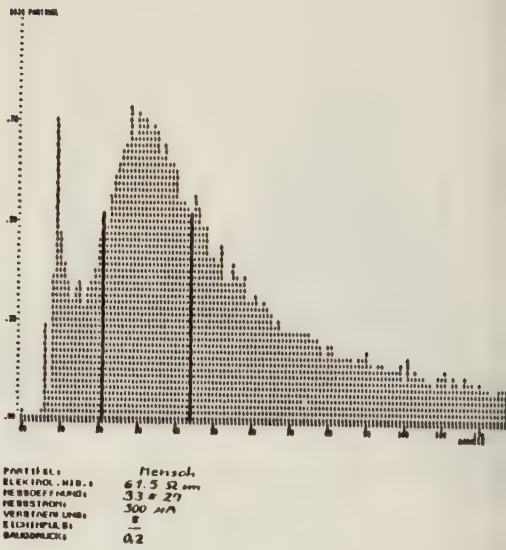
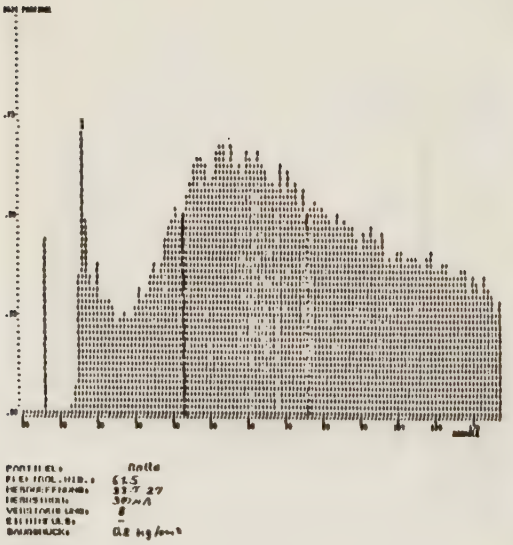


Abb. 8: Ergebnisse elektronischer Volumetrie mit den Thrombozyten von Hund, Kaninchen und Katze. Die Messungen erfolgten bei einer Stromstärke von 300 µA. Als Referenzsystem wurden Latexpartikel mit einem mittleren Durchmesser von 1,83 µm gemessen.







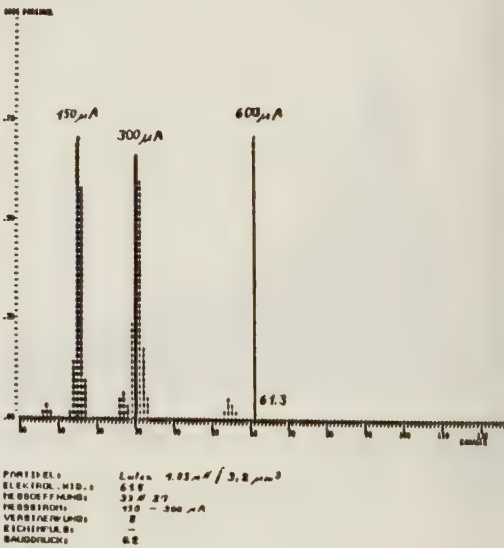


Abb. 9: Ergebnisse elektronischer Volumetrie mit den Thrombozyten von Meerschweinchen, Mensch und Ratte. Die Messungen erfolgten bei einer Stromstärke von 300 µA. Als Referenzsystem wurden Latexpartikel mit einem mittleren Durchmesser von 1,83 µm gemessen.

Tab. VI: Ergebnisse elektronischer Volumenmessung von Thrombozyten verschiedener Säugetiere.

	Spezies	Volumen (μm^3)	Dmax (μm)
1.	Hund	4,16 ± 1,12	2,00
2.	Kaninchen	3,43 ± 0,93	1,87
3.	Katze	2,89 ± 0,60	1,77
4.	Meerschweinchen	3,79 ± 0,95	1,93
5.	Mensch	3,55 ± 0,71	1,89
6.	Ratte	6,49 ± 1,05	2,31
7.	Rhesusaffe	4,17 ± 0,84	2,00
8.	Schaf	1,63 ± 0,38	1,46
9.	Schwein	----------	----
10.	Ziege	1,69 ± 0,36	1,48

II. Stereologische Analyse der Thrombozyten und ihrer Organellen

1. Berechnung von Oberflächen und Volumina der transmissionselektronenmikroskopisch vergrößerten Thrombozyten

Um aus den morphometrischen Primärdaten die Raumanteile der drei zellulären Organellen ermitteln zu können, mußten zunächst aus den Flächen der verschiedenen Thrombozytenanschnitte die betreffenden Gesamtzellvolumina und -oberflächen berechnet werden. Anhand der Ergebnisse dieser Beobachtungen, die in Tab. V aufgelistet sind, ließen sich die 10 getesteten Mammalia in die thrombozytäre Größenfolge einteilen. Das absolut größte Volumen (V) mit 12,20 μm^3 und die größte Oberfläche (S) besaßen danach die Katzenplättchen. Diesen folgte eine Thrombozytengruppe, die vom Kaninchen (V: 7,79 μm^3, S: 21,78 μm^2) und Schwein (V: 7,41 μm^3, S:20,28 μm^2) angeführt wurde und der noch der Hund (V: 7,21 μm^3, S: 20,78 μm^2) und der Rhesusaffe (V: 7,01 μm^3, S: 14,86 μm^2) angehörten. Die kleinsten Zellen fanden sich nach diesen Berechnungen in einer Gruppe, zu der die Blutplättchen vom Menschen (V: 5,72 μm^3, S: 14,61 μm^2), dem Meerschweinchen (V: 5,17 μm^3, S: 20,35 μm^2), der Ratte (V: 4,68 μm^3, S: 17,54 μm^2), dem Schaf (V: 3,88 μm^3, S: 12,02 μm^2) und der Ziege (V: 3,34 μm^3, S: 10,66 μm^2) zu zählen waren.

2. Auswertung der an α-Granula erhobenen Daten

a. Volumendichte

Die schon bei der Schilderung der Flächenvermessungsergebnisse thrombozytärer α-Granula zwischen diversen Spezies auffallenden Unterschiede bestätigten sich wieder bei der Berechnung der V_V (Abb. 10; längsschraffierte Säulen) für denselben Organelltyp, bei der das Volumen der α-Granula auf ein Referenzvolumen (im Falle der vorliegenden Arbeit auf 1 μm^3 Zellwürfel) bezogen wurde. So besaßen die Blutplättchen des Schafs (25,65 ± 07,08 μm^0) und der Ziege (25,48 ± 8,24 μm^0) die signifikant größten Volumendichten ($p<0,05$), danach folgten die V_V-Werte des Schweins (15,39 ± 4,91 μm^0) und der Ratte (14,87 ± 4,78 μm^0). Diese unterschieden sich wiederum statistisch signifikant ($p<0,05$) von den Thrombozyten des Menschen (11,90 ± 3,28 μm^0), des Kaninchens (11,30 ± 5,82 μm^0), des Rhesusaffen (10,37 ± 3,79 μm^0), der Katze (9,83 ± 4,05 μm^0) und des Hundes (9,24 ± 3,84 μm^0). Mit einem mittleren Wert von 7,86 ± 2,89 μm^0 errechnete sich für die Meerschweinchenthrombozyten die statistisch ($p<0,05$) niedrigste V_V der α-Granula.

b. Oberflächendichte

Die höchsten S_V-Werte (Abb. 10; gepunktete Säulen) fanden sich in einer Gruppe, der die Blutplättchen vom Schaf (3,47 ± 0,83 μm^{-1}), der Ziege (3,41 ± 1,09 μm^{-1}) und dem Schwein (3,36 ± 1,65 μm^{-1}) angehörten. Darauf folgten die Thrombozyten der Ratte (2,88 ± 0,95 μm^{-1}), des Meerschweinchens (2,60 ± 0,84 μm^{-1}) und des Menschen (2,57 ± 0,70 μm^{-1}). Die kleinsten thrombozytären S_V-

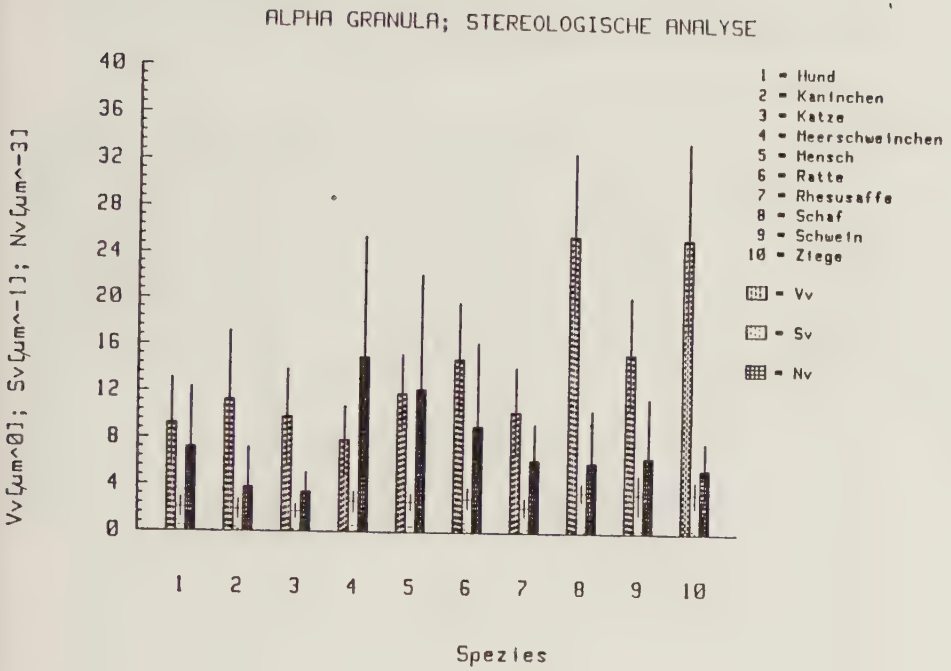


Abb. 10: Ergebnisse der stereologischen Berechnungen (V_V = Volumendichte; S_V = Oberflächendichte; N_V = numerische Dichte) aus den morphometrischen Primärdaten von thrombozytären α-Granula verschiedener Säugetiere. Die Daten beziehen sich jeweils auf eine Thrombozyten-Referenzfläche von 1 μm^3 (Mittelwerte und S.D.).

Werte für α-Granula besaßen die Thrombozyten des Rhesusaffen ($2,17 \pm 0,76\ \mu m^{-1}$), des Hundes ($2,04 \pm 0,86\ \mu m^{-1}$), des Kaninchens ($1,88 \pm 0,91\ \mu m^{-1}$) und der Katze ($1,73 \pm 0,62\ \mu m^{-1}$). Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der drei Gruppen waren statistisch signifikant ($p<0,05$).

c. Numerische Dichte

Die höchsten N_V-Werte (Abb. 10 ; karierte Säulen) -eine Größenangabe zur Anzahl von Substrukturen innerhalb eines definierten Zellvolumens- fanden sich in den Blutplättchen des Meerschweinchens ($14,99 \pm 10,46\ \mu m^{-3}$) und des Menschen ($12,28 \pm 9,84\ \mu m^{-3}$). Hiervon unterschieden sich statistisch signifikant ($p<0.05$) die N_V-Werte einer zweiten Gruppe, der die Thrombozyten von Ratte ($9,12 \pm 7,10\ \mu m^{-3}$), Hund ($7,21 \pm 5,12\ \mu m^{-3}$), Schwein ($6,53 \pm 5,05\ \mu m^{-3}$) und Rhesusaffe ($6.22 \pm 3,09\ \mu m^{-3}$) angehörten. Die kleinsten N_V-Werte für α-Granula errechneten sich fur die Thrombozyten des Schafs ($6,05 \pm 4,40\ \mu m^{-3}$), der Ziege ($5,52 \pm 2,25\ \mu m^{-3}$), des Kaninchens ($3,78 \pm 3,38\ \mu m^{-3}$) und der Katze ($3,38 \pm 1,67\ \mu m^{-3}$).

3. Auswertung der an Dense Bodies erhobenen Daten

a. Volumendichte

Die V_V-Werte der D.B. (Abb. 11; längsschraffierte Säulen) rangierten insgesamt bei allen untersuchten Thrombozyten der verschiedenen Säugetierarten zwischen 70 - 85% unter denjenigen der Vergleichswerte für die α-Granula. Sie ähnelten in ihrer Größenordnung denjenigen der Mitochondrien (Abb. 12; längsschraffierte Säulen). Die größte V_V an D.B. besaß das Kaninchen ($4,32 \pm 2,57\ \mu m^0$), gefolgt vom Hund ($4,10 \pm 2,80\ \mu m^0$), der Ratte ($3,77 \pm 1,89\ um^0$), der Ziege ($3,63 \pm 2,26\ um^0$), dem Schaf ($3,48 \pm 3,24\ \mu m^0$), der Katze ($3,25 \pm 1,90\ \mu m^0$) und dem Menschen ($2,90 \pm 3,16\ \mu m^0$). In einer zweiten Gruppe, der die Blutplättchen des Rhesusaffen ($2,26 \pm 1,19\ \mu m^0$), des Meerschweinchens ($2,12 \pm 1,56\ \mu m^0$) und des Schweins ($1,69 \pm 1,43\ \mu m^0$) angehörten, fanden sich deutlich kleinere V_V-Werte. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten beider Gruppen waren statistisch signifikant ($p<0,05$).

b. Oberflächendichte

Auch die S_V (Abb. 11; gepunktete Säulen) der D.B. waren gegenüber den S_V-Werten der α-Granula um ca. 60 - 90% (Schwein) kleiner und ähnelten wiederum denjenigen der Mitochondrien (Abb. 12; gepunktete Säulen). Wie schon bei den Ergebnissen der Volumendichten wiesen die Kaninchen- ($1,16 \pm 0,70\ \mu m^{-1}$), Ratten- ($0,98 \pm 0,42\ \mu m^{-1}$) und Schafsthrombozyten ($0,85 \pm 0,83\ \mu m^{-1}$) die höchsten Werte auf, gefolgt von denjenigen des Hundes ($0,80 \pm 0,46\ \mu m^{-1}$), der Katze ($0,76 \pm 0,43\ \mu m^{-1}$), des Meerschweinchens ($0,68 \pm 0,37\ \mu m^{-1}$), des Menschen ($0,66 \pm 0,73\ \mu m^{-1}$), des Rhesusaffen ($0,66 \pm 0,36\ \mu m^{-1}$) und der Ziege ($0,64 \pm 0,41\ \mu m^{-1}$). Von diesen setzten sich die Schweinethrombozyten mit dem absolut kleinsten S_V-Wert ($0,42 \pm 0,37\ \mu m^{-1}$) signifkant ($p<0,05$) ab.

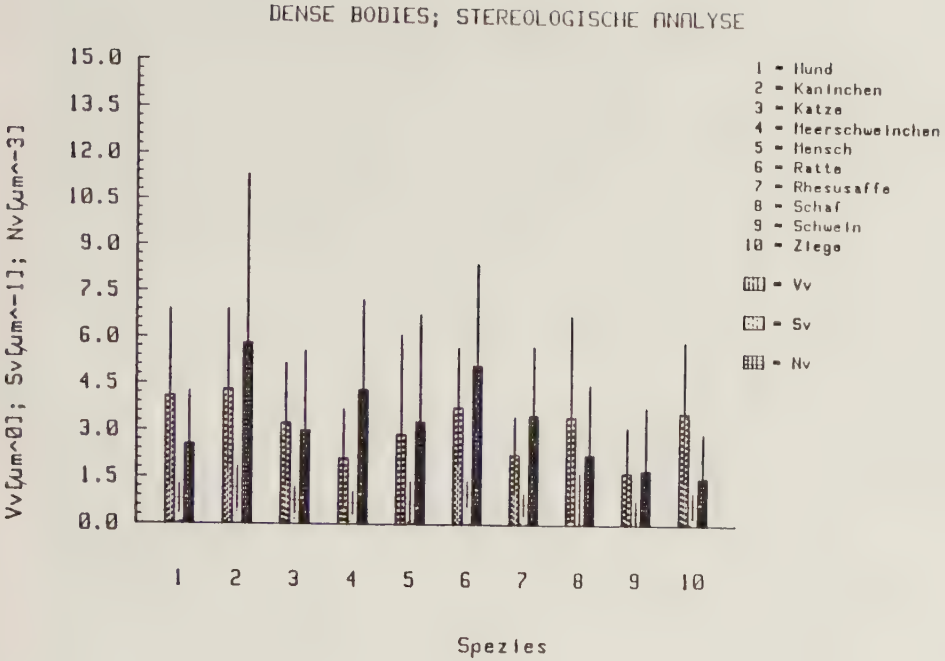


Abb. 11: Ergebnisse der stereologischen Berechnungen (V_V = Volumendichte; S_V = Oberflächendichte; N_V = numerische Dichte) aus den morphometrischen Primärdaten von thrombozytären Dense Bodies verschiedener Säugetiere. Die Daten beziehen sich jeweils auf eine Thrombozyten-Referenzfläche von 1 μm^3 (Mittelwerte und S.D.).

c. Numerische Dichte

Im Vergleich zu V_v- und S_v-Ergebnissen unterschieden sich diejenigen der N_v-Bestimmungen (Abb. 11; karierte Säulen) nicht so sehr voneinander; die Daten für die D.B. lagen um bis zu ca. 60% unter denen der α-Granula. Wiederum rangierte der mittlere N_v-Wert für die Thrombozyten des Kaninchens (5,82 ± 5,48 μm^{-3}) an der Spitze, daran schlossen sich mit statistisch signifikant ($p<0,05$) niedrigeren N_v-Werten die Blutplättchen der Ratte (5,12 ± 3,30 μm^{-3}), des Meerschweinchens (4,32 ± 2,89 μm^{-3}), des Rhesusaffen (3,53 ± 2,19 μm^{-3}), des Menschen (3,30 ± 3,44 μm^{-3}), der Katze (3,01 ± 2,54 μm^{-3}) und des Hundes (2,57 ± 1,67 μm^{-3}) an. Geringere N_v-Werte wiesen die Thrombozyten des Schafs (2,26 ± 2,22 μm^{-3}) und des Schweins (1,77 ± 1,99 μm^{-3}) auf, von denen sich die Blutplättchen der Ziege (1,53 ± 1,40 μm^{-3}) nochmals signifikant absetzten ($p<0,05$).

4. Auswertung der an Mitochondrien erhobenen Daten

a. Volumendichte

In Abb. 12 sind die Ergebnisse dr stereologischen Verrechnung für die Mitochondrien, die in den Thrombozyten der verschiedenen Spezies vermessen worden waren, als Säulendiagramme aufgetragen; die längsschraffierten Säulen geben die V_v-Werte der Mitochondrien wieder. Die höchsten mittleren V_v-Werte errechneten sich für die Blutplättchen vom Schwein (4,97 ± 4,09 μm^0), von der Ratte (4,50 ± 2,62 μm^0) und Ziege (4,38 ± 3,77 μm^0). Hunde- (3,87 ± 2,80 μm^0), Meerschweinchen- (3,57 ± 2,87 μm^0) und Schafsplättchen (3,19 ± 2,97 μm^0) dagegen wiesen niedrigere, Human- (2,93 ± 2,51 μm^0), Katzen- (2,76 ± 2,04 μm^0), Rhesusaffen- (2,64 ± 2,44 μm^0) und Kaninchenthrombozyten (1,87 ± 2,48 μm^0) die niedrigsten durchschnittlichen V_v-Werte auf. Infolge der sehr hohen interindividuellen Variationsbreite, die sich in den großen Standardabweichungen ausdrückte, ließ sich jedoch für keinen der angegebenen Werte eine statistisch signifikante ($p>0,05$) Abweichung von den übrigen Resultaten errechnen.

b. Oberflächendichte

Für die mittleren S_v-Werte der thrombozytären Mitochondrien, in Abb. 12 als gepunktete Säulen wiedergegeben, ließ sich ebenfalls ein zwischen den verschiedenen Mammalia bestehender Unterschied ($p>0,05$) statistisch nicht sichern. Nach den eigenen Vermessungen errechneten sich für die Mitochondrien der diversen Säugetierthrombozyten folgende S_v-Werte: Meerschweinchen (1,00 ± 0,97 μm^{-1}), Schwein (0,97 ± 0,65 μm^{-1}), Ratte (0,92 ± 0,46 μm^{-1}), Ziege (0,68 ± 0,54 μm^{-1}), Hund (0,67 ± 0,46 μm^{-1}), Mensch (0,67 ± 0,52 μm^{-1}), Schaf (0,58 ± 0,53 μm^{-1}), Rhesusaffe (0,54 ± 0,47 μm^{-1}), Katze (0,48 ± 0,35 μm^{-1}) und Kaninchen (0,35 ± 0,45 μm^{-1}).

c. Numerische Dichte

Durch interindividuelle Schwankungen in der Anzahl thrombozytärer Mitochondrien ergaben sich auch für die errechneten N_v-

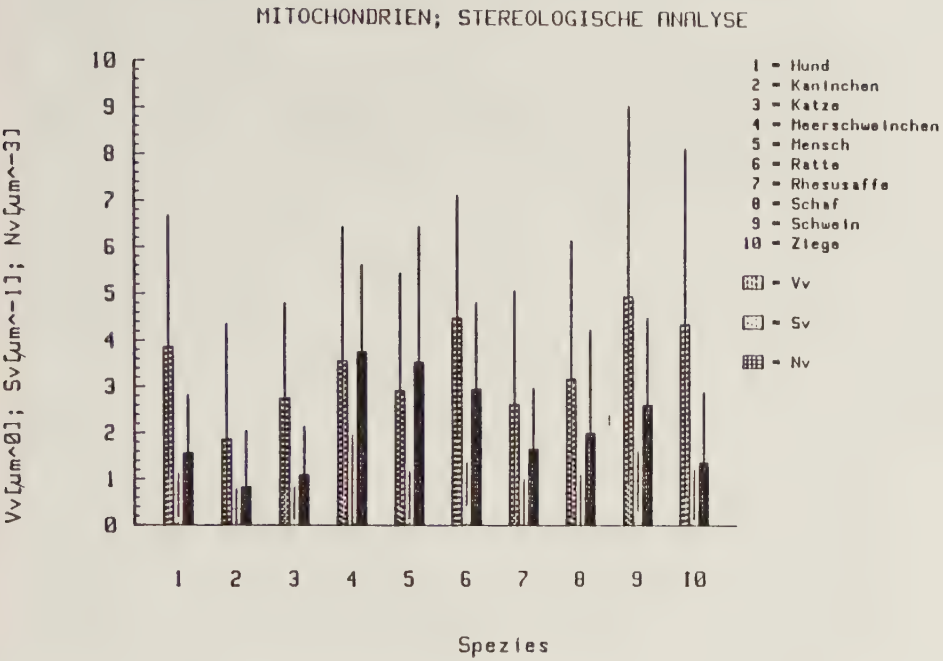


Abb. 12: Ergebnisse der stereologischen Berechnungen (V_V = Volumendichte; S_V = Oberflächendichte; N_V = numerische Dichte) aus den morphometrischen Primärdaten von thrombozytären Mitochondrien verschiedener Säugetiere. Die Daten beziehen sich jeweils auf eine Thrombozyten-Referenzfläche von 1 μm^3 (Mittelwerte und S.D.).

Werte bei den verschiedenen Spezies, in Abb. 12 als karierte Säulen dargestellt, relativ hohe Standardabweichungen. Die Thrombozyten vom Meerschweinchen (3,77 ± 1,85 μm^{-3}), Menschen (3,55 ± 2,90 μm^{-3}), der Ratte (2,97 ± 1,85 μm^{-3}), des Schweines (2,63 ± 1,87 μm^{-3}) und Schafs (2,02 ± 2,22 μm^{-3}) führten die Rangfolge der N_V-Werte an, danach folgten die Blutplättchen vom Rhesusaffen (1,67 ± 1,31 μm^{-3}), vom Hund (1,57 ± 1,25 μm^{-3}), der Ziege (1,38 ± 1,51 μm^{-3}) und der Katze (1,10 ± 1,03 μm^{-3}). Kaninchenthrombozyten (0,84 ± 1,20 μm^{-3}) enthielten die geringste Zahl an Mitochondrien pro Zellvolumen. Unterschiede zwischen den Spezies waren statistisch nicht festlegbar ($p>0,05$).

D. Diskussion

I. Prüfung der Genauigkeit der benutzten Meßsysteme

1. Halbautomatisches Bildanalysesystem

Im Rahmen ausführlicher Vorversuche wurde das halbautomatische Bildanalysesystem vor der Verwendung zur Morphometrie licht-, raster- und transmissionselektronenmikroskopisch vergrößerter Thrombozytenpräparate auf seine Meßgenauigkeit untersucht. Zu dieser Prüfung waren von Latexpartikeln definierter Form und Größe, deren Durchmesser etwa demjenigen normaler menschlicher Blutplättchen entsprachen, ebenfalls Ausstrichpräparate und rasterelektronenmikroskopisch vergrößerte Abbildungen angefertigt worden. Die mit dem manuell-optischen Analysesystem von solchen Vorlagen gewonnenen Durchmesser wichen, nach adäquater Verrechnung der jeweiligen Vergrößerungsstufen, stets weniger als 1% von den Herstellerangaben ab. Wenn man nun berücksichtigt, daß hier Fehler von Seiten der Meßvorlage (z.B. ungenaue Konturenschärfe), des Meßsystems (begrenztes Auflösungsvermögen) und des Untersuchers die Ergebnisse beeinflussen und verfälschen könnten, so dokumentiert dieses Resultat doch die gute Eignung des halbautomatischen Gerätes für die vorgesehenen morphometrischen Studien. Durch den Anschluß eines Tischrechners mit relativ hoher Speicherkapazität konnte ein eventuell bestehender Nachteil des halbautomatischen Bildauswertgerätes gegenüber einem vollautomatisch arbeitenden System, nämlich der geringere Durchsatz von Einzelmessungen pro Zeit, zumindest teilweise kompensiert werden. Außerdem sollte das manuell-optische Vermessungsgerät wegen eines exakteren Strukturerkennungsvermögens durch das menschliche Auge und einer höheren Strukturdifferenzierungsfähigkeit durch den Untersucher vollautomatischen Meßgeräten auch heute noch eindeutig überlegen sein. Dies gewinnt vor allem dann an Bedeutung, wenn zelluläre Strukturen und darin zu differenzierende Substrukturen sich nur durch geringgradig voneinander abweichende Graustufen unterscheiden, wie es bei TEM-Vorlagen der Fall ist.

2. Elektronisches Volumeter

Das für die elektronische Volumetrie ausgewählte Metricell® soll nach Angaben seiner Konstrukteure (53) gegenüber den heute noch üblichen Geräten deutliche Vorteile besitzen. Zwar arbeitet das Metricell® ebenso, wie die anderen elektronischen Volumeter, nach dem sogen. Coulter-Prinzip (§ D. IV). An der Meßkapillare werden dagegen durch eine "hydro-dynamische" Fokussierung nur die Zellen des Zentralstroms ausgewertet, während der Randstrom, in dem infolge verschiedener Faktoren Fehlerbestimmungen möglich sind (95), ausgeblendet bleibt. Auch das Metricell® wurde vor jeder Plättchenvolumetrie mehrmals mit Latexpartikeln bekannter Größe geeicht.

II.Prinzipien der Histostereologie und ihre Anwendung auf Thrombozyten

Zur Berechnung der Raumanteile, die die Organellen in Blutplättchen einnehmen, wurden stereologische Formeln eingesetzt, die über morphometrierte ein- bzw. zweidimensionalen Primärparameter (Anzahl, Fläche und Umfang) einen Einblick in die dritte Dimension liefern sollen. Grundlage solcher Kalkulationen ist die erstmals von Delesse (32) 1847 aufgestellte Beziehung zwischen der Fläche des Schnittes durch einen Körper und dessen Volumen. Danach entspricht die Summe aller Einzelschnittflächen (A) pro Referenzschnittfläche (A), heute üblicherweise als Flächendichte (A_A) bezeichnet, der Summe aller Einzelvolumina (V) eines Referenzvolumens (V) des Körpers; es sei also $A_A = V_V$. Von diesem sogen. Delesse-Prinzip ausgehend entwickelten Saltykov (86) sowie Weibel und Gomez (103) Berechnungsformeln, die auch Aussagen zur Oberflächen- und numerischen Dichte von Strukturen in einem Testvolumen erlauben.

Zu Beginn der Anwendung stereologischer Prinzipien in der Morphologie mußten die Primärparameter Fläche und Umfang noch mit Hilfe einer relativ umständlichen und zeitaufwendigen Punktzählmethode gewonnen werden, die Glagolev (42) entwickelt hatte. Dazu wurde ein geometrisches Testsystem, meist ein Gitter aus Punkten mit einer definierten Punktdichte, auf die Testfläche gelegt bzw. in das mikroskopische Präparat eingespiegelt, und alle Punkte, die die zu untersuchende Struktur trafen, ausgezählt. Die Summe aller Trefferpunkte (P) pro Testpunktzahl (P), die sogen. Punktdichte P_P, wurde der Volumendichte VV gleichgesetzt.

In der vorliegenden Studie wurden Fläche und Umfang der zellulären Strukturen und Substrukturen direkt manuell-optisch vermessen, mit dem Tischrechner abgespeichert und statistisch weiterverarbeitet. Zur stereologischen Verrechnung wurde speziell ein den Mikrokomputer steuerndes Programm entworfen (Abb. 5), das im wesentlichen die von Weibel angegebenen Formeln (101) benutzt. Die Integration von Meß- und Rechnereinheit ermöglichte Aufnahme und Verarbeitung einer relativ großen Anzahl von Einzeldaten, wodurch die Aussagefähigkeit der stereologischen Analysen zweifelsohne optimiert wurde.

Wenn nun auch durch die Anwendung stereologischer Prinzipien zweidimensionalen Anschnitten biologischen Untersuchungsmaterials rechnerisch die räumliche Tiefe verliehen werden kann und damit falsche Interpretationen von Strukturanschnitten vermieden werden (35) - sie werden oftmals unzutreffend als sphärische Körper behandelt - so ist einschränkend doch anzumerken, daß die Validität stereologischer Aussagen stets von der konsequenten Einhaltung bestimmter Kriterien bei Planung und Ausführung einer Studie abhängen. Eine der zu fordernden Voraussetzungen ist die klare histologische Definition der zu messenden Strukturen, eine weitere die randomisierte Auswahl der Meßvorlagen. Bei vergleichenden Studien muß außerdem verlangt werden, daß die aus verschiedenen Gruppen stammenden Meßproben so einheitlich wie möglich vor-

behandelt werden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Studie bedeutet dies, daß stets das gleiche Fixationsmedium und Einbettungsmaterial benutzt sowie ein konstanter pH- und Osmolalitätswert bei der Probenherstellung eingehalten werden mußte (83).

Der ersten der hier aufgestellten Forderungen wurde versucht, durch ein intensives Studium der bisher vorgelegten Fachliteratur - in diesem Zusammenhang sind die sehr subtilen, bebilderten Beschreibungen von White (110) und Hovig (48) zu erwähnen - gerecht zu werden. Um repräsentative Aussagen über die Raumanteile intrathrombozytärer Organellen bei den verschiedenen Säugetieren machen zu können, wurde, wenn möglich und vertretbar, das Blut von mehreren Individuen einer Spezies gepoolt, daraus nach intensivem Vermischen eine Probe entnommen , für die Transmissionselektronenmikroskopie aufbereitet und aus mehreren eingebetteten Probenblöckchen einige zufällig zur Anfertigung der Bildvorlagen ausgewählt.

III. Bestimmungen der Thrombozytengrößen

1. Manuell-optisch erhobene Daten

Die Resultate der beiden Untersuchungsserien, die die Morphometrie licht- und rasterelektronenmikroskopisch vergrößerter Zellpräparate zum Gegenstand hatten, bestätigte die aus der bisher verfügbaren Literatur (50,82) bekannten Befunde; es bestehen tatsächlich signifikante Größenunterschiede zwischen den Blutplättchen der diversen Säugetiere. Diese Beobachtungen verwundern nicht so sehr, wenn man bedenkt, daß auch bei den anderen Blutzellen bzw. Zellfragmenten unter den verschiedenen Säugetieren z.T. erhebliche Form- und Größendifferenzen beobachtet wurden (104). Ein genauerer Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denjenigen anderer Arbeitsgruppen läßt jedoch deutliche Diskrepanzen erkennen. Während nach der vorliegenden Arbeit der Mensch und das Meerschweinchen die größten, Schaf und Ziege hingegen die kleinsten Blutplättchen aufweisen, sollen nach Prost-Dvojakovic et al. (82) (Größenmessungen anhand von Ausstrichpräparaten) gerade die Thrombozyten von Hund und Katze zu den größten, die des Kaninchens und der Ratte zu den kleinsten der Säugetierplättchen insgesamt gehören. Die von dieser Arbeitsgruppe angegebenen absoluten Größen weichen teilweise mit 10 bis 25% von den eigenen Resultaten ab. Ebensowenig stimmen die Resultate von Jain (50) - Größenmessungen an rasterelektronenmikroskopisch vergrößerten Thrombozytenpräparaten - mit den eigenen überein. Danach sollen Hund, Katze, Schaf und Ziege Blutplättchen mit deutlich höheren Durchmessern besitzen als die Resultate der eigenen REM-Größenmessungen an denselben Spezies waren; die Größenangaben liegen durchschnittlich um 30 bis 40% über den selbstgefundenen Werten. Ordnet man die eigenen Ergebnisse und diejenigen der zitierten Arbeitsgruppen in eine zwischen den Thrombozyten der verschiedenen Spezies gefundene Größenrangfolge ein, so zeigt sich nicht einmal eine auch nur annähernd trendmäßige Übereinstimmung.

Diese Differenzen mögen auf einer unterschiedlichen Präparationstechnik der Blutplättchenproben beruhen. Leider sind den zitierten Publikationen wesentliche Details über die Herstellung der Meßvorlagen nicht zu entnehmen. In einer früheren Veröffentlichung (5) wurde z.B. der Einfluß der Blutentnahmetechnik auf Form und Größe der Thrombozyten beschrieben. Auch die Inkubationsdauer und -temperatur der Blutprobe in vitro stellen nach verschiedenen Untersuchungen Zellmorphologie verändernde Faktoren dar (14,59,115). Den wesentlichen Effekt auf die Thrombozytengröße dürfte aber zweifelsohne die Art der Formstabilisierung solcher Zellen vor ihrer Vermessung besitzen (28,45,106). In der vorliegenden Arbeit wurden die Blutplättchen der verschiedenen Säugetiere stets gleichmäßig vorbehandelt, soweit es zumindest der anschließende Meßvorgang erlaubte. Die Thrombozytenpräparate zur licht- und rasterelektronenmikroskopischen Größenmessung innerhalb einer Spezies entstammten jeweils denselben Blutproben. Diese waren unter strengster Vermeidung von Luftkontakt mit denselben Medien fixiert worden und wurden mit demselben Bildanalysesystem ausgewertet. Daher verwundert es nicht, daß die Größenhierachie sowohl bei den licht- als auch bei den rasterelektronenmikrokopisch vergrößerten Plättchenpräparaten bis auf kleine, statistisch nicht signifikante Abweichungen gleich blieb. Die absoluten Größendifferenzen, -die REM-Präparate fielen im Schnitt um 25% kleiner aus als die lichtmikroskopisch vermessenen- müssen auf die Trocknung der Blutplättchen (Critical-point-Methode) zur Vorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie zurückgeführt werden (111). Unterschiede in der Meßmethodik und in der Vorbereitungstechnik der Blut- und Plättchenproben für die Größenmessungen mögen auch als Erklärung für die Differenzen der eigenen Ergebnisse zu denjenigen dienen, die in neuerer Zeit von anderen Autoren publiziert wurden. Nach Frojmovic (35) und Frojmovic und Panjwani (36), die zur Größenmessung eine selbstentwickelte sogen. rheo-optische Methode benutzten, sollen die mit Glutaraldehyd fixierten Blutplättchen von Kaninchen und Mensch beispielsweise maximale Durchmesser von 3,10 $\pm$ 0,42 µm (Kaninchen) bzw. 3,64 $\pm$ 0,72 µm (Mensch) besitzen; die Vergleichswerte der eigenen Studie liegen um etwa 30% niedriger.

2. Elektronische Volumenmessung

Die elektronische Größenbestimmung von Blutplättchen beruht auf dem sogen. Coulter-Prinzip (21, § B.IV.4), d.h. beim Durchfluß einer Thrombozyten-haltigen Elektrolyt-Lösung durch ein elektrisches Spannungsfeld innerhalb einer Kapillare erhöht sich der Widerstand, sobald ein Blutplättchen das Spannungsfeld passiert. Dabei ist die Höhe der Widerstandsänderung grundsätzlich proportional zum Volumen des sie hervorrufenden Thrombozyten. Dieses Meßprinzip, zunächst mit viel Erfolg nur zur Zählung von Blutzellen angewendet, wird heute weltweit und routinemäßig in der klinischen Labordiagnostik auch zur Bestimmung von Zellvolumina eingesetzt. Die Bedeutung einer solchen, relativ einfach durchzuführenden diagnostischen Maßnahme besonders für das thrombozytäre System hat in den letzten Jahren zugenommen, seitdem bekannt ist, daß eine ganze Reihe von Erkrankungen mit Größen- und Formveränderungen der Blutplättchen einhergehen

(33,39,55,75,90,96,115). Die mit dem Metricell® an fixierten Zellen erhobenen Daten wiesen ebenfalls auf signifikante, zwischen den verschiedenen Spezies herrschende thrombozytäre Größenunterschiede hin. Die Werte stimmen offenbar aber nicht mit denjenigen überein, die manuell-optisch erhoben wurden. Das trifft sowohl für die absoluten Größen als auch für Größenrangfolge unter den diversen Säugetierplättchen zu. In der Regel wurden elektronisch bis zu 30% kleinere Thrombozyten -ausgenommen die Ergebnisse bei Ratte und Ziegenplättchen- gemessen, als mit der Licht- und Rasterelektronenmikroskopie. Nach der letzteren Technik besaßen der Mensch und das Meerschweinchen die größten, Schaf und Ziege die kleinsten Blutplättchen; elektronisch erwiesen sich gerade die Zellen der Ratte, des Hundes und des Rhesusaffen als die größten. Dabei waren auch hier die Meßproben jeweils dem pro Spezies gleichen Pool entnommen und bis auf kleine, unbedeutende Maßnahmen vor ihrer Analyse in gleicher Weise präpariert worden.

Ähnliche Unstimmigkeiten tauchen auf, wenn man die Ergebnisse der eigenen elektronischen Thrombozytovolumetrie denjenigen gegenüberstellt, die der vergleichbaren Literatur zu entnehmen sind. Nach vergleichenden elektronischen Untersuchungen von Lewis (63) an 11 verschiedenen Säugetieren soll das Blut von Katzen die mit Abstand größten ($15,10_3 \pm 3,00\ \mu m^3$), das vom Kaninchen die kleinsten ($3,99 \pm 0,13\ \mu m^3$) Thromboyzten enthalten. Tschopp (98) sowie Nakeff und Ingram (74) teilen für die Blutplättchen der Katze ($12,27 \pm 0,34\ \mu m^3$), des Menschen ($7,74 \pm 0,22\ \mu m^3$) und des Hundes ($7,17 \pm 0,33\ \mu m^3$) erheblich größere, für diejenigen der Ratte ($5,37 \pm 0,09\ \mu m^3$), also kleinere Zellvolumina mit, als sie in eigenen Studie gemessen wurden.

Und noch ein weiterer, möglicherweise recht bedeutender Unterschied läßt sich zwischen den Beobachtungen anderer Autoren und den Ergebnissen der eigenen elektronischen Thrombozytengrößenanalyse ausmachen. Immer wieder sind (speziell im Zusammenhang mit den Blutplättchen vom Menschen) zwei in Größe und Dichte deutlich voneinander zu trennende Zellpopulationen beschrieben worden, die bei einem einzigen Individium nachweisbar sein sollen, über deren Herkunft jedoch keine Einigkeit besteht. Nach Karpatkin und Mitarbeitern (2,17,54,56) sowie Corash et al. (18,19) soll die Heterogenität der Blutplättchen auf ihrem unterschiedlichen Alter, nach Penington mit Mitarbeitern (66,78,79,80), Paulus (77), Leone et al. (60) sowie Boneu mit Mitarbeitern (11,75) auf einer Verschiedenartigkeit der Mutterzelle der Thrombozyten, den Megacaryozyten, beruhen. Wie dem auch sei, bei den Untersuchungen für die vorliegende Arbeit ergaben sich weder bei den manuell-optischen noch bei den elektronischen Größenanalysen Hinweise für das gleichzeitige Vorhandensein zweier differenter Zellpopulationen bei einem Individuum. Dies gilt sowohl für das thrombozytäre System des Menschen, als auch für dasjenige der übrigen untersuchten Säugetiere.

Bereits früher (40) wurde schon einmal darauf hingewiesen, daß Unterschiede der beschriebenen Art meßtechnische Gründe haben könnten. Die zitierten Arbeitsgruppen gewannen, soweit es den

Publikationen zu entnehmen ist, ihre Daten mit Geräten, die noch nicht die Fähigkeit der hydro-dynamischen Fokussierung besaßen, bei denen also Meßfehler die Resultate hätten verfälschen können. Außerdem dürften auch wieder z.T. unterschiedliche Präparationstechniken der Blutproben vor der Vermessung der Blutplättchen zu Buche schlagen. Ebenso aber wird eine schlüssige Erklärung der manuell-optisch beobachteten Differenzen zwischen den eigenen Größenmessungen und den elektronisch gewonnenen Daten zumindest zunächst noch nicht geliefert werden können. So weiß man bis heute beispielsweise nicht, welchen Einfluß die verschiedenen Zelloberflächen, - unfixiert oder fixiert - auf eine elektronische Volumetrie ausüben; eine ganz besondere Rolle dürften hier, nach theoretischer Überlegung, voneinander abweichende Zellmembranpotentiale spielen, die sich durch den Fixationsprozeß verändern könnten. Insgesamt läßt sich zum gegenwärtigen Stand der Meßtechnik aufgrund der vorgelegten Untersuchungen sagen, daß Resultate elektronischer Thrombozytenvolumetrie nur mit Vorsicht bewertet werden dürfen und besonders zum Zwecke einer klinischen Diagnostik noch nicht herangezogen werden sollten.

IV. Stereologische Analyse der Thrombozyten

Das Heranziehen TEM-vergrößerter Zellanschnitte zu deren Größenbestimmungen wird immer problematisch sein, wenn die Zellen sphärisch oder ellipsoid bzw. diskoid und nicht prismatisch bzw. kubisch geformt sind. Bei der Auswahl der Blutplättchendarstellungen zur Messung ihrer maximalen Längs- und Querdiameter wurde als Kriterium eines Schnittes durch die Medianebene, senkrecht zur thrombozytären Äquatorialebene, die marginalen Tubuli gewählt (Abb. 4). Diese sollten als kreisrunde, quergetroffene Zylinderanschnitte an den beiden Zellpolen imponieren. Daß ein solches Auswahlprinzip sinnvoll sein kann, bewiesen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Vergleicht man die vorher anhand der LM- und REM-Technik aufgestellten thrombozytären Größenhierachien mit den Ergebnissen dieser Versuchsserie, so zeigen sich - ausgenommen der Meerschweinchen- und Katzenplättchen - gute Übereinstimmungen. Wieder erwiesen sich die Thrombozyten von Mensch und Rhesusaffe als die größten, die von Schaf und Ziege als die kleinsten der untersuchten Zellen. Erneut muß die Parallelität der eigenen, mit verschiedenen Methoden gewonnenen Resultate auf die identische Vorbereitung der Blutproben (Blutentnahme und -aufbereitung etc.) zurückgeführt werden. Auch hier entsprechen die eigenen Resultate denjenigen, die der vergleichbaren Literatur zu entnehmen sind. Für die Blutplättchen des Menschen geben Stahl et al. (91) aufgrund ihrer Analyse transmissionselektronenmikroskopisch vergrößerter Präparate ein mittleres maximales Volumen von 6,42 μm^3 an, in der eigenen Untersuchung lag dieser Wert bei 5,72 μm^3. Nach den TEM-Studien von Lewis et al. (62) haben die Thrombozyten des Rhesusaffen einen maximalen Durchmesser von 2,68 $\pm$ 0,59 μm, die an der gleichen Tierart selbsterstellten thrombozytären Maximaldiameter betragen 2,56 $\pm$ 0,42 μm.

Die Thrombozyten gehören zu den am frühesten und intensivsten submikroskopisch examinierten Zellen des menschlichen Körpers (112); die Gründe hierfür sind sicher vielfältig. Zum

einen sind diese Blutzellen recht leicht zugängig und doch nicht, zumindest für den Histologen, so uniform wie rote Blutkörperchen oder so relativ selten wie die meisten Zellen des weißen Blutbildes. Andererseits enthalten ungereizte Blutplättchen von Zytoplasmamembranen umhüllte Strukturen, die ihren Inhalt bei adäquater Stimulation nach außen freisetzen und sich auch wieder auffüllen können. Durch diese Fähigkeiten erinnern die Thrombozyten an synaptische Endformationen von Nervenzellen. Sie wurden in der Tat auch schon häufig als Modell für die experimentell sehr viel schwieriger verfolgbare Neurotransmission, zum Studium der dabei sequentiell ablaufenden Zellprozesse herangezogen (93).

Im Jahre 1958 wurden erstmals morphologisch faßbare Unterschiede zwischen normalen Blutplättchen und solchen, die aus dem Blut von Patienten mit einer v. Willebrand'schen Krankheit stammten, beschrieben (87). Seither hat sich eine Vielzahl von Forschungsgruppen mit den unter physiologischen Verhältnissen vorhandenen thrombozytären Substrukturen beschäftigt und deren Änderungen bei einer bestimmten Reihe von Erkrankungen aufgedeckt, deren Kardinalsymptom stets ein Thrombozyten-Funktionsdefekt ist (11,13,24,49,51,58,68). Ende der sechziger Jahre gelang es, die Wirkung exogener, die Zellfunktion stimulierender Substanzen auf die Blutplättchen submikroskopisch zu verfolgen und die ablaufenden Vorgänge festzuhalten (48). Damit waren die Grundlagen gelegt für eine in den letzten 15 Jahren an Umfang zunehmende Serie Publikationen zur thrombozytären Ultrastruktur (3,65,108,110,116). Wie üblich in einem relativ neuen Zweig der medizinischen Forschung herrschte zumindest bei der Bezeichnung der elektronenoptisch differenzierbaren intrathrombozytären Substrukturen eine terminologische Vielfalt, die fast in eine babylonische Sprachverwirrung zu enden drohte. Da war von α-Granules (51), dense α-granules (27), very dense α-granules (27), dense bodies (47), HT-Granula (92), 5-HT-Granula (73), very dense bodies (23), very electron dense bodies (48), bull's eye granules (48) oder schlicht vesicles (88), membraneous structures (65) bzw. soluble membranes (27) die Rede. Erst den intensiven Bemühungen einer kleinen Zahl engagierter Forscher (46,110) ist es zu verdanken, daß die Nomenklatur der Thrombozytenorganellen in letzter Zeit weitgehend vereinheitlicht wurde.

Nach ihrer Größe und Dichte unterscheiden wir heute zwei Hauptgruppen von Organellen (47):

a) die α-Granula - sphärische, in Humanthrombozyten im Mittel 300-500 nm messende und von einer Einheitsmembran umgebende Gebilde (Abb. 13); sie machen den größten Teil der intrathrombozytär gelegenen Organellen aus, und

b) die D.B. (Abb. 13) - mit einem mittleren Durchmesser von 250-300 nm in Humanthrombozyten kleiner als die α-Granula und nach Osmiumkontrastierung am elektronendichtesten von allen Organellen; sie zeichnen sich weiterhin durch das höchste spezifische Gewicht aller zellulären Substrukturen (1,21 g x cm^{-3}) aus und sind deshalb mit Hilfe einer fraktionellen Ultrazentrifugation von den übrigen Zellbestandteilen relativ einfach abtrennbar

(37). Durch die Fixationsprozesse der Blutplättchen vor ihrer TEM-Darstellung schrumpft der Inhalt der D.B. häufig soweit zusammen, daß sie bis auf einen stets wandständigen, kugelrunden, maximal kontrastierten Rest fast leer erscheinen (Abb. 4).

In verschiedenen Thrombozytenanschnitten stellten sich neben den genannten Granula Vesikel unterschiedlicher Grösse dar, die zum intrazellulären canaliculären System gehören. Dieses System steht, wie Abb. 2 erkennen lässt, an verschiedenen Stellen mit der Zelloberfläche in Verbindung (s. a. Abb. 13); sie sollen als zytomembranäres Oberflächenreservoir bei Zellformveränderungen dienen (110).

So variabel anfänglich die Bezeichnung der Thrombozytengranula war, so wichen auch Meinungen und Vorstellungen über deren Inhalt voneinander ab. Heute ist man allgemein übereingekommen, in den α-Granula die Speicherorte der thrombozytenspezifischen Proteine (38,47) (Plättchenfaktor 4 und ß-Thromboglobulin), kationischer Proteine und einiger Gerinnungsfaktoren (Fibrinogen und Faktor V) anzusehen. Zellfermente - wie die sauren Phophatasen und andere Hydrolasen -sollen in Untergruppen der α-Granula enthalten sein (7,8,22), die jedoch nach Holmsen und Weiss (47) sowie Fukami und Salganicoff (38) eine eigene Gruppe, die der lysosomalen Granula, bilden. Lysosomale und α-Granula sind jedoch auf herkömmlicher TEM-Abbildungen nicht voneinander abtrennbar; hierzu bedarf es einer spezifischen Aufbereitung der Thrombozytenschnitte. Die D.B. der Humanthrombozyten gelten als Speicherstellen der biogenen Amine, sowohl der Adeninnukleotide ATP, ADP und AMP als auch des 5-Hydroxytryptamins oder Serotonins (25,107); außerdem soll ein großer Teil des intrazellulären Kalziums, das für die Funktion der Thrombozyten von überragender Bedeutung scheint, in diesem Organelltyp gespeichert sein (67). Die Meßvorlagen, die für die stereologischen Untersuchungen angefertigt worden waren, gestatteten eine, nach o.a. Kriterien zu treffende (manchmal etwa schwerfallende) Unterscheidung in α-Granula, D.B. und Mitochondrien (Abb. 4). Die letzteren setzten sich meist gut durch das Vorhandensein intrakorpuskulärer Doppellamellen von den anderen Organellen ab.

Die vorliegende Studie dokumentiert nun, daß zwischen den Blutplättchen der verschiedenen Säugetiere auch z.T. erhebliche Differenzen hinsichtlich ihrer intrathrombozytären Raumanteile an den erwähnten Speicherorganellen herrscht. Danach werden die höchsten Werte für Volumen- und Oberflächendichte an α-Granula in den Thrombozyten von Ziege und Schaf nachgewiesen. Die höchste numerische Dichte dieser Organellen errechnete sich für die Blutplättchen des Meerschweinchens und des Menschen. Am Ende der Vergleichsskala für alle drei stereologischen Größen rangierten die Katzenthrombozyten. Den absolut größten Raumanteil (V_v,S_v,N_v) an D.B. besitzen die Kaninchenplättchen, die Schweinethrombozyten dagegen enthalten die wenigsten und kleinsten dieser Speicherorte. Die Mitochondrien sind offenbar gleichmäßig über die Blutplättchen aller Säugetiere verteilt.

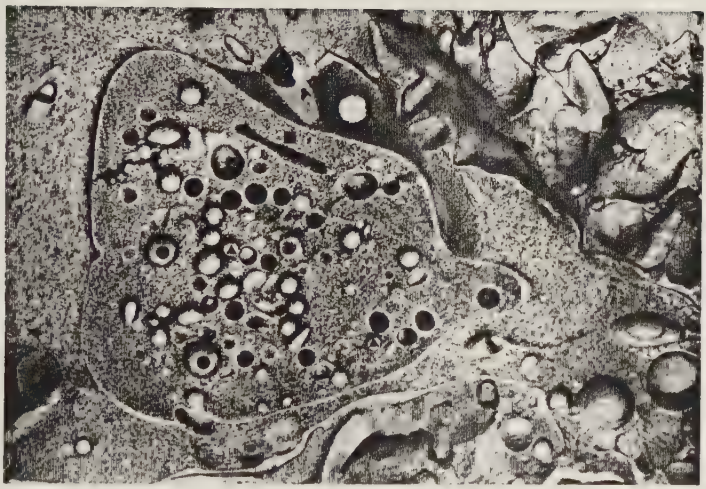


Abb. 13: Gefrierschnittpräparat eines 30.000fach vergrößerten Thrombozyten (aus 57). Das Präparat zeigt die deutlichen Größenunterschiede der intrathrombozytären Speicherorganellen.

● = α-Granula

▲ = Dense Bodies

■ = Anteile des canaliculären Systems

Bisher sind nur wenige mit der vorliegenden Arbeit vergleichbare Beobachtungen zu diesem Fragenkomplex publiziert worden. So haben Stahl und Mitarbeiter (91) stereologische Daten zur Verteilung intrazellulärer Organellen in Humanthrombozyten vorgelegt, Morgenstern und Kho (73) bzw. Lewis und Bowie (61) den intrathrombozytären Raumanteil von α-Granula, D.B. und Mitochondrien zwischen Mensch und Schwein verglichen und Lewis et al. (61) über ähnliche Untersuchungen mit den Thrombozyten verschiedener Primaten berichtet. Weitgehende Übereinstimmungen bestehen zwischen den eigenen, an TEM-vergrößerten Präparaten erhobenen Befunden und denjenigen der zitierten Literatur, was Gesamtzell-Fläche und -Volumen sowie die Zahl und Größe der intrazellulären α-Granula in Human-, Schweine- und Rhesusaffenthrombozyten anbelangt. Hinsichtlich der Raumanteile der Dense Bodies und Mitochondrien gibt es jedoch große Meinungsverschiedenheiten. So ist der Volumenanteil der D.B. nach den Beobachtungen von Stahl et al. (91) beim menschlichen Thrombozyten mit 1,2 um^0 etwa die Hälfte niedriger als der selbst gefundene Vergleichswert; die von Lewis et al. (62) angegebene numerische Dichte dieser Organellen bei Rhesusaffen liegt sogar um den Faktor 40 unterhalb des eigenen Vergleichswertes. Die Mitochodrien, nach den eigenen Ergebnissen mit im Mittel 3 Organellen pro Schnittfläche etwa gleichmäßig über die verschiedenen Säugetierthrombozyten verteilt, sollen beim Menschen ebenfalls um die Hälfte geringer (92), ihre numerische Dichte beim Schwein um 50 % (61), die Volumendichte sogar um 70% niedriger sein (73). Diskrepanzen der beschriebenen Art verwundern jedoch nicht so sehr, wenn man berücksichtigt, daß solche Resultate u.a. von der Präparationstechnik der Meßproben bis hin zu ihrer TEM-Aufnahme, von einer geeigneten Probenwahl bis zur Differenzierbarkeit der zellulären Unterstrukturen, abhängen.

Setzt man jetzt einmal voraus, daß alle Fehlerquellen bei den vergleichenden stereologischen Studien durch konsequente Standardisierung der Vorbereitungstechnik der Blutproben der verschiedenen Säugetiere und durch identisches Vorgehen bei der Auswahl, Vermessung und Verrechnung der diversen Meßvorlagen in der vorliegenden Arbeit soweit als möglich ausgeschlossen worden waren. Nimmt man weiterhin an, daß die α-Granula neben den Thrombozytenproteinen auch lysosomale Enzyme enthalten, die Dense Bodies Hauptspeicher der biogenen Amine sind.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse müßten dann die Thrombozyten von Schaf und Ziege besonders viel, die Plättchen vom Meerschweinchen wenig an lysosomalen Enzymen beinhalten, in den Plättchen vom Kaninchen und Hund eine hohe, in denen vom Schwein eine niedrige Konzentration biogener Amine angetroffen werden. Daß solche einfachen Korrelationen nicht aufzustellen sind, offenbart ein Vergleich der stereologischen Resultate mit den Befunden zweier cytochemischer Studien. Nach Vergleichsstudien von Meyers et al. (70) läßt sich z.B. in den Schweinethrombozyten eine sehr hohe Gesamtkonzentration freisetzbarer, in den D.B. gespeicherter Substanzen (ATP, ADP, Serotonin, Mg^{2+}, Ca^{2+}) nachweisen. Diese Blutplättchen haben aber nach eigenen Untersuchungen den vergleichsweise geringsten Raumanteil an D.B.. Andererseits ist in den Thrombozyten vom Hund, die recht viele und große

D.B. besitzen, der Gesamtgehalt liberalisierbarer biogener Amine und divalenter Katione sehr niedrig; er rangiert am unteren Ende einer Vergleichsliste, die mit den Blutplättchen vom Menschen und vier Haustieren aufgestellt werden kann (70). Die Beobachtung, daß die Thrombozyten vom Schwein eine relativ hohe Gesamt-ATP- und -ADP-Konzentration enthalten, wird durch eine zweite Untersuchung (6) gestützt. Nach dieser Studie folgen auf die Schweinethrombozyten diejenigen von Katze und Mensch. Abermals haben hier die Hundethrombozyten mit einem relativ großen Raumanteil von D.B. den geringsten Adeninnukleotidgehalt. Der zitierten Publikation sind ebenfalls vergleichende Angaben zur intrathrombozytären Konzentration einer sauren Zellhydrolase, der ß-Glucoronidase bei verschiedenen Säugetierarten zu entnehmen. Bei z.T. erheblichen interindividuellen wie auch zwischen den einzelnen Spezies bestehenden Unterschieden wurde die größte Aktivität dieses lysosomalen Enzyms in den Thrombozyten von Katze und Mensch, die niedrigste in den Schweineplättchen angetroffen. Bei einer vergleichsweise hohen enzymatischen Aktivität haben z.B. auch hier wieder die Human- und Hundethrombozyten einen dafür relativ kleinen Speicherraum (die α-Granula werden in der vorliegenden Arbeit als Lokalisation der ß-Glucoronidase angesehen).

Die augenfälligen Diskrepanzen zwischen der Kapazität thrombozytärer Speicherorte und der Menge ihres tatsächlichen Inhaltes sind auf verschiedene Weise erklärbar. Zum einen beschränkt sich der Inhalt der Organellen nicht auf die in den zitierten Arbeiten erwähnten Substanzen; der Anteil der verschiedenen, im selbem Raum gespeicherten Substanzen kann aber variabel sein. Andererseits könnte angenommen werden, daß die jeweiligen Speicherinhalte in einer von Spezies zu Spezies wechselnden intrathrombozytären Packungsdichte vorliegen. Sollte es schließlich Proteine geben, die für die Stabilisierung granulär gespeicherter Faktoren verantwortlich sind, so wäre durchaus denkbar, daß auch solche Eiweiße in einer von Spezies zu Spezies variablen Konzentration auftreten könnten. Die vorliegende Studie jedenfalls gibt Anlaß zu der Mahnung, nicht schon aus histologisch faß- und quantifizierbaren Raumanteilen intrazellulärer Speicherorganellen alleine ein Urteil über die Konzentration der in solchen Strukturen üblicherweise gespeicherten Substanzen zu fällen.

Schließlich - und das war eine der Fragestellungen, die die vorliegenden Untersuchungen veranlaßten - muß festgestellt werden, daß sich zwischen der früher beschriebenen (97) und den nun morphometrisch/stereologisch gesicherten Strukturunterschieden bei den Blutplättchen von verschiedenen Mammalien keine Wechselbeziehungen aufzustellen sind. Die Vergleichsstudien zur Zellfunktion in vitro hatten zum Ergebnis, daß aus einer Reihe von Thrombozytenproben, die vom Menschen, vom Meerschweinchen und 6 weiteren verschiedenen Haustieren (Rind, Schwein, Schaf, Katze, Hund und Kaninchen) stammten, exogenes ADP bei ausreichender Ca^{2+}-Konzentration im Suspensionsmedium am ausgeprägtesten die Blutplättchen von Mensch und Kaninchen, am wenigsten die vom Schaf und Hund zur zellulären Aneinanderlagerung aktivierte. Gegenüber Kollagen reagierten abermals die Human- und Kaninchenthrombozyten am heftigsten, die des Meerschweinchens und Hundes

so gut wie gar nicht. Adrenalin aggregierte lediglich die Plättchen des Menschen des Schafs und der Katze, während auf die Zugabe Serotonin nur noch Human- und Schafsthrombozyten Reaktionen im Sinne einer Aggregation zeigten. Legt man diese Resultate denen der vorliegenden Arbeit an, so sind weder Korrelationen zu den unterschiedlichen Thrombozytengrößen noch zu den Ergebnissen der stereologischen Verrechnung der Zellorganellen auffällig, m.a.w. die funktionellen Differenzen, die zwischen den Blutplättchen der verschiedenen Mammalia bei in vitro feststellbar sind, lassen sich durch zytomorphologische oder stereologische Befunde nicht erklären.

E. ZUSAMMENFASSUNG

An Thrombozyten von zehn verschiedenen Säugetieren (Hund, Kaninchen, Katze, Meerschweinchen, Mensch, Ratte, Rhesusaffe, Schaf, Schwein, Ziege) wurden in einer systematisch-vergleichenden Studie Zellgröße (maximaler Durchmesser, Umfang, Fläche) und Raumanteil (Volumen-, Oberflächen- und numerische Dichte) dreier intrazellulärer Organellen (α-Granula, Dense Bodies, Mitochondrien) bestimmt. Die Zellgrößen wurden mit einem halbautomatischen Bildanalysesystem an licht, raster- und transmissionselektronenmikroskopisch vergrößerten Präparaten sowie mit einem elektronischen Volumeter gemessen. Zur Speicherung und stereologischen Verrechnung der morphometrischen Primärdaten wurde ein Mikrocomputer benutzt, der mit Hilfe eines selbstentwickelten Programmes gesteuert wurde. Die Untersuchungen kamen zu folgenden Resultaten:

1) Bei der manuell-optischen Bildanalyse lassen sich signifikante Größendifferenzen zwischen den Blutplättchen der zehn Mammalia feststellen; Human-, Rhesusaffen- und Meerschweinchenthrombozyten haben die größten, Schafs- und Ziegenplättchen die kleinsten Durchmesser.

2) Infolge der Fixation und weiterer Aufbereitung schrumpfen die Thrombozytenpräparate um bis zu 20%.

3) Die mit dem elektronischen Instrument bestimmten Plättchenvolumina weichen so deutlich von denjenigen ab, die manuell-optisch erhoben wurden, daß der Einsatz solcher Zytovolumeter in der klinischen Laborroutinediagnostik z.Zt. noch fraglich erscheint.

4) Die thrombozytär-strukturellen Differenzen sind nicht zu korrelieren mit Funktionsunterschieden, die für die Blutplättchen der gleichen Säugetiere beschrieben worden sind.

5) Zwischen dem Raumanteil der intrazellulären Speicherorganellen bei den verschiedenen Säugetierthrombozyten und der von anderen Autoren angegebenen Menge dort gespeicherter Substanzen (α-Granula: lysosomale Enzyme, PF_4, ß-TG bzw. Dense Bodies: biogene Amine) lassen sich ebenfalls keine Korrelationen ausmachen; d.h. das Fassungsvermögen submikroskopisch quantifizierbarer, intrathrombozytärer Speicherräume kann nicht als Maß für die tatsächlich dort enthaltenen Substanzen gelten.

F. LITERATURHINWEISE

1. Addonizio, V.P.; Edmunds, L.H.; Colman, R.W.:
Function of monkey (M. Mulatta) platelets compared to platelets of pig, sheep, and man.
J. Lab. clin. Med. 91:989-998 (1978)

2. Amorosi, E.; Garg, S.K.; Karpatkin, S.:
Heterogeneity of human platelets. IV. Identification of a young platelet population with ^{75}Se-selenomethionine.
Br. J. Haematol. 2:227-232 (1971)

3. Behnke, O.:
Electron microscopic observation on the membrane system of rat platelets.
Anat. Rec. 158:121-137 (1967)

4. Behnke, O.:
Microtububles in disk shaped blood cells.
Int. Rev. exp. Path. 9:1-92 (1970)

5. Benner, K.U.; Geeren, M.:
Problems of comparative blood platelet sizing.
Verh. Anat. Ges., Jena (im Druck)

6. Benner, K.U.; Geeren, M.; Burstedde, V.:
Comparative cytochemical and stereological studies on blood platelets from five mammalian species.
Conf. Proc. 2nd Symp. Morph. morphol. Diagnosis (Kuopio, im Druck)

7. Bentfield, M.E.; Bainton, D.F.:
Cytochemical localization of lysosomal enzymes in rat megacaryocytes and platelets.
J. clin. Invest. 56:1635-1639 (1975)

8. Bettex-Galland, M.; Lüscher, E.F.:
Extraction of an actomyosin-like protein from human thrombocytes.
Nature (Lond.) 184:276-277 (1959)

9. Bizzozero, J.:
Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung.
Virchows Arch. path. Anat. Physiol. 90:261-332 (1882)

10. Bloom, G.:
The morphology of human platelets and the coagulation of human blood in vitro.
Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 42:365-385 (1955)

11. Boneu, B.A.; Caranobe, C.; Capdeville, J.; Robert, A.; Bierme, R.:
Quantitative evaluation of mepacrine labelled human platelet dense bodies in normals and in cases of peripheral thrombocytopenia.
Thromb. Res. 12:831-839 (1978)

12. Braunsteiner, H.:
Electron microscopy of blood platelets.
In: Johnson S.A.; Monto, R.W.; Rebuck, J.W.; Horn, R.C. (eds), Blood Platelets, pp. 617-628, (Little, Brown & Co, Boston 1960)

13. Breton-Gorius, J.; Guichard, J.:
Two different types of granules in megacaryocytes and platelets as revealed by the diaminobenzidine reaction.
J. Microsc. Biol. cell 23:197-202 (1975)

14. Bull, B.S.; Zucker, M.B.:
Changes in platelet volume produced by temperature, metabolic inhibitors, and aggregating agents.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120:296-301 (1965)

15. Bush, C.; Wasteson, A.; Westermark, B.:
Release of cell-growth promoting factor from human platelets.
Thromb. Res. 8:493-512 (1970)

16. Carvalho, A.C.A.; Colman, R.W.; Lees, R.S.:
Platelet function in hyperlipoproteinemia.
New Engl. J. Med. 290:434-438 (1974)

17. Charmatz, A.; Karpatkin, S.:
Heterogeneity of rabbit platelets. I. Employment of an albumin density gradient for separation of a young platelet population identified with ^{75}Se-selenomethionine.
Thromb. Diath. haemorrh. 31:485-492 (1974)

18. Corash, L.; Shaffer, B.; Perlow, M.:
Heterogeneity of human whole blood platelet subpopulations. II. Use of subhuman primate model to analyze the relationship between density and platelet age.
Blood 52:736-734 (1978)

19. Corash, L.; Tan, H.; Gralnick, H.R.:
Heterogeneity of human whole blood platelet subpopulations. I. Relationship between buoayant density, cell volume and ultrastructure.
Blood 49:71-87 (1977)

20. Cotton, R.C.; Bloor, K.; Archibald, G.:
Inter-relationships between platelet response to adenosine diphosphate, blood coagulation and serum lipids in patients with arterial occlusive atherosclerosis.
Atherosclerosis 16:337-348 (1972)

21. Coulter, W.H.:
High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer.
Proc. Natl. Electron Conf. 12:1034-1040 (1956)

22. Da Prada, M.; Iakabova, R.; Lüscher, E.F.; Pletscher, A.; Richards, J.G.:
Subcellular localization of heparin-neutralizing factor in blood platelets.
J. Physiol. 257:495-501 (1976)

23. Da Prada, M.; Pletscher, A.; Tranzer, J.P.; Knuchel, H.:
Subcellular localization of 5-hydroxytryptamine and histamine in blood platelets.
Nature (Lond.) 216:1315-1317 (1967)

24. David-Ferreira, J.F.:
The blood platelet: electron microscopic studies.
Int. Rev. Cytol. 17:99-148 (1964)

25. Davis, R.B.; White, J.G.:
Localization of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. A radioautographic and ultrastructural study.
Br. J. Haematol. 15:93-99 (1968)

26. Day, H.J.; Ang, G.A.T.; Holmsen, H.:
Platelet release-reaction during clotting of native human platelet rich plasma.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 139:717-721 (1972)

27. Day, H.J.; Holmsen, H.; Hovig, T.:
Subcellular particles of human platelets. A biochemical and electronmicroscopic study with particular reference to the influence of fractionation techniques.
Scand. J. Haematol. 7:suppl., pp. 29-38 (1969)

28. Day, H.J.; Holmsen, H.; Zucker, M.B.:
Methods for separating platelets from blood and plasma.
Thromb. Diath. haemorrh. 33:648-654 (1975)

29. Day, H.J.; Stormorken, H.; Holmsen, H.:
Subcellular localisation of platelet factor 3 and platelet factor 4.
Scand. J. Haematol. 10:254-260 (1973)

30. De Robertis, E.; Paysero, P.; Reissig, M.:
Electron microscopic studies of the action of thrombin on blood platelets.
Blood 4:587-596 (1953)

31. Eberth, H.J.; Schimmelbusch, C.:
III. Experimentelle Untersuchung über Thrombose.
Virchows Arch. path. Anat. 103:39-87 (1886)

32. Delesse, M.A.:
Procede mecanique pour determiner la composition des roches.
C. R. Acad. Sci. 25:544-551 (1847)

33. Eldor, A.; Avitzour, M.; Or, R.; Hanna, R.; Penchas, S.:
Prediction of haemorrhagic diathesis in thrombocytopenia by mean platelet volume.
Br. J. Haematol. 285:397-400 (1982)

34. Elias, H.:
Identification of structure by the common sense approach.
J. Microsc. 95:59-65 (1978)

35. Frojmovic, M.M.:
Rheo-optical studies of blood cells.
Biorheology 12:193-205 (1975)

36. Frojmovic, M.M.; Panjwani, R.:
Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies.
J. biol. Phys. 16:1071-1089 (1976)

37. Fukami, M.H.; Bauer, J.S.:
An improved method for the isolation of serotonin storage granules from human platelets.
Fed. Proc. 36:1083-1091 (1977)

38. Fukami, M.H.; Salganicoff, L.:
Human platelet storage organelles.
Thromb. Haemostasis 38:963-970 (1977)

39. Garg, S.K.; Lachner, K.H.; Karpatkin, S.:
The increased percentage of megathrombocytes in various clinical disorders.
Ann. intern. Med. 77:361-369 (1972)

40. Geeren, M.; Benner, K.U.:
Vergleichende elektronische Volumenbestimmung an den Blutplättchen verschiedener Spezies.
In: Schreiber, R. (ed), Hämostase bei Herzfehlern und Angiopathien, pp. 39-43 (Müller & Steinicke, München 1981)

41. Gjesdal, K.:
Platelet function and plasma free fatty acids during acute myocardial infarction and severe angina pectoris.
Scand. J. Haematol. 17:509-513 (1977)

42. Glagolev, A.A.:
On the geometrical methods of quantitative mineralogic analysis of rocks.
Trans. Inst. Econ. Min. 59:1-48 (1933)

43. Gormsen, J.; Nielsen, J.D.; Dalsgaard, J.; Anderson, I.A.:
ADP-induced platelet aggregation in vitro in patients with ischemic heart disease and peripheral thromboatherosclerosis.
Acta med. scand. 201:509-513 (1977)

44. Grette, M.:
Studies on the mechanism of thrombin catalysed haemostatic reactions on blood platelets.
Acta physiol. scand. 56:suppl. 195:9-93 (1962)

45. Hatori, A.; Sanada, M.; Iizumi,T.; Ito, S.; Iizumi, T.; Matzuoka, M.:
Study on platelet shape and its relation to function.
Blood Vessels 8:588-597 (1977)

46. Holmsen, H.:
Mechanisms of platelet secretion.
In: Rotman, A.; Meyer, F.A.; Gitler, C.; Silberberg, A. (eds), Platelets: Cellular Response Mechanisms and their Biological Significance. pp. 249-263 (John Wiley & Sons Ltd., New York 1980)

47. Holmsen, H.; Weiss, H.J.:
Secretable storage pools in platelets.
Annu. Rev. Med. 30:119-134 (1979)

48. Hovig, F.:
The ultrastructure of blood platelets in normal and abnormal states.
Ser. haematol. 1:3-64 (1968)

49. Hutter, R.V.P.:
Electron microscopic observations on platelets from human blood.
Am. J. clin. Path. 28:447-461 (1957)

50. Jain, N.C.:
A scanning electron microscopic study of platelets of certain animal species.
Thromb. Diath. haemorrh. 33:501-506 (1975)

51. Jean, G.; Racine, L.; Gautier, A.; Marx, R.:
Granulations dense anormales dans les thrombocytes humains.
Thromb. Diath. haemorrh. 10:42-53 (1963)

52. Jorgensen, L.; Hovig, T.; Rowsell, H.C.; Mustard, J.F.:
Adenosine-diphosphate induced platelet aggregation and vascular injury in swine and rabbits.
Am. J. Path. 61:161-1

53. Kachel, V.:
Basic principles of electrical sizing of cells and particles and their realization in the new instrument "Metricell".
J. Histochem. Cytochem. 24:211-230 (1976)

54. Karpatkin, S.:
Heterogeneity of human platelets. VI. Further resolution of changes in platelet density, volume, and radioactivity following cohort labelling with ^{75}Se-selenomethionine.
Br. J. Haematol. 39:459-469 (1978)

55. Karpatkin, S.; Amorosi, E.L.:
Platelet heterogeneity.
Br. J. Haematol. 35:681-682 (1977)

56. Karpatkin, S.; Freedman, M.L.:
Hypersplenic thrombocytopenia differentiated from increased peripheral destruction by platelet volume.
Ann. intern. Med. 89:200-203 (1978)

57. Keyhani, E.:
Etude au microscope electronique de la structure des megacaryoctes de cobaye par la technique de cryo-decapage. Comparaison avec la technique des coupes.
J. Microscopie 9:63-72 (1970)

58. Koppel, K.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Funktions-morpholgie der Thrombozyten und zum Gerinnungsablauf im normalen menschlichen Nativblut.
Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 47:401-427 (1958)

59. Laufer, N.; Grover, N.B.; Ben-Sasson, S.; Freund, H.:
Effects of adenosine diphosphate, colchicine and temperature on size of human platelets.
Thromb. Haemostasis 41:491-497 (1979)

60. Leone, G.A.; Agostini, A.; Decrescenzo, A.; Bizzi, B.:
Platelet heterogeneity: relationship between buoayant density, size, lipid peroxidation and platelet age.
Scand. J. Haematol. 23:204-210 (1979)

61. Lewis, J.C.; Bowie, E.J.W.:
Ultrastructural studies of platelets of von Willebrand and normal swine.
Mayo Clin. Proc. 53:179-183 (1978)

62. Lewis, J.C.; Cowley, L.H.; Taylor, R.G.; Clarkson, T.B.:
Ultrastructural analysis of platelets in nonhuman primates.
Exp. molec. Path. 32:175-187 (1980)

63. Lewis, J.H.:
Comparative hematology: mammalian platelets.
In: Ulutin, O.N. (ed), Platelets, pp.19-23 (Excerpta med., Amsterdam 1975)

64. MacMillan, D.C.; Sim, A.K.:
A comparative study of platelet aggregation in man and laboratory animals.
Thromb. Diath. haemorrh. 24:385-394 (1970)

65. Marcus, A.J.; Zucker-Franklin, D.; Safier, L.B.; Ullmann, H.L.:
Studies on human platelet granules and membranes.
J. clin. Invest. 45:14-28 (1966)

66. Martin, J.F.; Shaw, T.; Heggie, J.; Penington, D.G..:
Measurement of density of human platelets and its relationship to volume.
Br. J. Haematol. 54:337-352 (1983)

67. Martin, J.H.; Carson, F.L.; Sofier, L.; Race, G.J.:
Calcium containing platelet granules.
J. Cell Biol. 60:775-777 (1974)

68. Marx, R.; Jean, G.:
Studien zur Pathogenese der Thrombobasthenie Glanzmann-Naegeli.
Klin. Wschr. 40:942-949 (1962)

69. Mason, R.G.; Read, M.S.:
Platelet response to six agglutinating agents: species similarities and differences.
Exp. molec. Path. 6:370-381 (1967)

70. Meyers, K.M.; Holmsen, H.; Seachord, C.L.:
Comparative study of platelet dense granule constituents.
Am. J. Physiol. 243:454-461 (1982)

71. Mills, D.C.B.; Robb, I.A.; Roberts, G.C.K.:
The release of nucleotides, 5-hydroxytryptamine and enzymes from human blood platelets during aggregation.
J. Physiol. 195:715-729 (1968)

72. Morawitz, P.:
Die Chemie der Blutgerinnung.
Ergebn. Physiol. 4:307-328 (1905)

73. Morgenstern, E.; Kho, A.:
Morphometrische Untersuchungen an Blutplättchen: Veränderungen der Plättchenstruktur bei Pseudopodien-Bildung und Aggregation.
Eur. J. Cell Biol.: 15:233-249 (1977)

74. Nakeff, A.; Ingram, M.:
Platelet count:volume relationships in four mammalian species.
J. appl. Physiol. 28:530-533 (1970)

75. Nouvel, C.; Coranobe, C.; Sie, P.; Capdeville, J.; Pris, J.; Boneu, B.:
Platelet volume, density and 5-HT organelles (mepacrine test) in acute leukemia.
Scand. J. Haematol. 21:421-426 (1978)

76. Nugteren, D.H.; Jouvenaz, G.H.; Dutihl, C.E.:
Determination of prostaglandins and other products of arachidonate oxygenation on perfusates and during platelet aggregation.
Acta biol. med. germ. 37:701-706 (1978)

77. Paulus, J.M.:
Platelet size in man.
Blood 46:321-336 (1975)

78. Penington, D.G.:
The cellular basis of platelet production.
New Istanbul Contrib. Clin. Sci. 12:50-58 (1977)

79. Penington, D.G.; Lee, N.L.Y.; Roxburgh, A.E.; Mc Gready, J.R.:
Platelet density and size: the interpretation of heterogeneity.
Br. J. Haematol. 34:365-376 (1976)

80. Penington, D.G.; Streatfield, K.; Lee, N.L.Y.:
Platelet heterogeneity: a reply.
Br. J. Haematol. 35:683-684 (1977)

81. Pfleiderer, T.:
Phänomenologie und Bedeutung der Lipidwirkung auf Thromboyzten.
Fortschr. Med. 85:617-620 (1967)

82. Prost-Dvojakovic, R.J.; Le Tohic, F.; Boulard, C.:
Study on platelet volumes and diameters in 11 mammals.
In: Ulutin, O.N. (ed), Platelets, pp.30-36 (Excerpta med., Amsterdam 1975)

83. Romppanen, T.:
Practical approach to a morphometrical study.
In: Morphometry in Morphological Diagnosis. Collan, Y.; Romppanen, T. (eds), pp. 47-63 (Kuopio Univ. Press, Kuopio 1982)

84. Raccuglia, G.:
Gray platelet syndrome: a variety of qualitative platelet disorder.
Am. J. Med. 51:818-828 (1971)

85. Sachs, L.:
Angewandte Statistik: Statistische Methoden und ihre Anwendung; 5. Aufl.
(Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1978)

86. Saltykov, S.A.:
Stereometric Metallography; 3. Aufl.
(VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1974)

87. Schulz, H.; Jürgens, R.; Hiepler, E.:
Die Ultrastruktur der Thrombozyten bei der konstitutionellen Thrombopathie (v. Willebrand-Jürgens) mit einem Beitrag zur submikroskopischen Orthologie der Thrombozyten.
Thromb. Diath. haemorrh. 2:302-316 (1958)

88. Siegel, A.; Lüscher, E.F.:
Non-identity of the α-granules of human blood platelet with typical lysosomes.
Nature (Lond.) 215:745-47 (1967)

89. Sinakos, Y.; Caen, J.P.:
Platelet aggregation in mammalians (human, rat, rabbit, guinea-pig, horse, dog): a comparative study.
Thromb. Diath. haemorrh. 17:99-108 (1967)

90. Small, B.M.; Bettigole, R.E.:
Diagnosis of myeloproliferative disease by analysis of the platelet volume distribution.
Am. J. Clin. Path. 76:685-691 (1981)

91. Stahl, K.; Themann, H.; Dame, W.R.:
Ultrastructural morphometric investigations on normal human platelets.
Haemostasis 7:242-251 (1978)

92. Stockinger, L.; Weissel, M.; Lechner, K.:
Thrombozytenpräparation und Auswertung.
Mikroskopie 25:362:377 (1969)

Tab. I REAKTIONSMÖGLICHKEITEN DES THROMBOZYTÄREN SYSTEMS

FUNKTION	ERKLÄRUNG	BIOLOGISCHER EFFEKT	AUTOREN
Adhäsion	Zellhaftung an verletztem Gefäßendothel	Erster Schritt zur Bildung eines hämostatischen Pfropfes	Zahn, 1872; Bizzozero, 1882
Aggregation	Interaktion einzelner Plättchen	Wachstum des hämostatischen Pfropfes	Zahn, 1872; Bizzozero, 1882; Eberth & Schimmelbusch, 1886
Sekretion aus Speichergranula	a) aus Dense Bodies: Serotonin, ADP, Ca^{2+}	II. Phase der Plättchenaggregation (irreversibel),	Grette, 1962; Mills et al., 1968
	b) aus α-granules: lysosomale Enzyme, Heparin-neutral. Faktor (PF4), Fibrinogen, Wachstumsfaktor ?	Atheroskleroseförderung, Beteiligung an intravasaler Gerinnung und entzündlichen Prozessen, Zellproliferation	Jorgensen et al., 1970; Walsh & Biggs, 1972; Weksler, 1974; Zucker, 1974; Day et al., 1972; Walsh, 1973; Bush et al., 1970
Aktiver Transport	a) Serotonin b) Adenosin, Adeninnucleotide	Plasma-Serotonin-Clearance, Substrate zur Umwandlung metabolischer Nukleotide	White, 1969
Aktivierung von Membran-Phospho-Lipiden	Demaskierung von Plättchenfaktor 3 (PF3)	Gerinnungsförderung in Nachbarschaft eines Thrombozytenaggregats	Day et al., 1973
Synthese von Prostaglandinen	Produktion von PGE_2 und PGF_2 (bzw. kurzlebiger Intermediärprodukte)	Beteiligung an Entzündungsprozessen (PGE_2, $PGF_{2\alpha}$); die Intermediärprodukte sind aggregationsfördernd	Nugteren et al., 1973
Aktive Kontraktion	Thrombosthenin-Aktivierung (kontraktiles Protein, identisch mit Aktomyosin	Kontraktion des Blutgerinnsels	Bettex-Galland & Lüscher, 1959
Phagozytose	Inkorporation von u. kolloidalem Kohlenstoff	Unspezifische Abwehr, Blutreinigung	Pfleiderer, 1967; Behnke, 1967

93. Stormorken, H.:
The platelet release reaction: its general aspects and relation to phagocytosis/pinocytosis.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 107 suppl., pp. 115-120 (1969)

94. Ten Cate, J.W.; Vos, J.; Oosterhuis, H.; Prenger, D.; Jenkins, C.S.P.:
Spontaneous platelet aggregation in cerebrovascular disease.
Thromb. Haemostasis 39:223-229 (1978)

95. Thom, R.; Hampe, A.; Sauerbrey, G.:
Die elektronische Volumenbestimmung von Blutkörperchen und ihre Fehlerquellen.
Z. ges. exp. Med. 151:331-349 (1969)

96. Tomita, E.; Akatsuka, J.; Kokubun, Y.:
Differential diagnosis of various thrombocytopenias in childhood by analysis of platelet volume.
Pediat. Res. 14:133-137 (1980)

97. Tosch, U.:
Thrombozytenaggregation in vitro: Vergleichende Untersuchungen an acht verschiedenen Spezies.
Diss. Tech. Univ. München (1981)

98. Tschopp, T.B.:
Aggregation of cat platelets in vitro.
Thromb. Diathes. haemorrh. 23:601-620 (1970)

99. Walsh, P.N.:
Platelet coagulant activities: evidence for multiple different functions of platelets in intrinsic coagulation.
Ser. haematol. 6:576-581 (1973)

100. Walsh, P.N.; Biggs, R.:
The role of platelets in intrinsic factor Xa formation.
Br. J. Haematol. 22:743-760 (1972)

101. Weibel, E.R.:
Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology.
Int. Rev. Cytol. 26:235-302 (1969)

102. Weibel, E.R.:
Stereological Methods. Vol. 1: Practical Methods for Biological Morphometry.
(Academic Press Inc., London 1979)

103. Weibel, E.R.; Gomez, D.M.:
A principle for counting tissue structures on random sections.
J. appl. Physiol. 17:343-367 (1962)

104. Weidenreich, F.:
Gefäßsystem. Die Blutzellen der Wirbeltiere.
In: Bolk, L.; Göppert, E.; Kalhius, E.; Lubosch, W. (Hrsg.), Handbuch der vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere. Bd.6, pp.383-385 (Urban & Schwarzenberg, Berlin, Wien 1933)

105. Weksler, B.B.:
The platelet inflammation: interactions with complement to promote chemotaxis.
In: Baldini, M.G.; Ebbe, S. (eds), Platelets: Production, Function and Storage, pp. 277-299 (Grune & Stratton, New York 1974)

106. White, J.G.:
Effects of ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) on platelet structure.
Scand. J. Haematol. 5:241-254 (1968)

107. White, J.G.:
The dense bodies of human platelets. Origin of serotonin particles from platelet granules.
Am. J. Path. 53:791-808 (1968)

108. White, J.G.:
The dense bodies of human platelets: inherent electron opacity of the serotonin storage particles.
Blood 33:598-606 (1969)

109. White, J.G.:
The ultrastructural cytochemistry and physiology of blood platelets. In: Mostafi, F.K.; Brinkhous, K.M. (eds), The Platelet, pp. 83-115 (William & Wilkens, Baltimore 1971)

110. White, J.G.; Gerrard, J.M.:
The cell biology of platelets.
In: Glynn, L.E.; Honk, J.C.; Weissmann, G. (eds), Handbook of Inflammation Vol.2 pp.83-143 (Elsevier / North Holland, Amsterdam 1980)

111. Wollweber, L.; Stracke, R.; Gothe, U.:
The use of a simple method to avoid cell shrinkage during SEM preparation.
J. Microsc. 121:185-189 (1981)

112. Wolpers, C.; Ruska, H.:
Strukturuntersuchungen zur Blutgerinnung.
Klin. Wschr. 23:1077-1081, 1111-1117 (1939)

113. Wright, J.H.; Minot, G.R.
The viscous metamorphosis of blood platelets.
J. exp. Med. 26:395-409 (1917)

114. Zahn, W.:
Untersuchungen über Thrombose.
Zbl. med. Wiss. 9:129-130 (1872)

115. Zeigler, Z.; Murphy, S.; Gardner, F.H.:
Miroscopic platelet size and morphology in various hematologic disorders.
Blood: 51:479-485 (1978)

116. Zucker, M.B.; Grant, R.A.:
Aggregation and release-reaction induced in human blood platelets by zymosan.
J. Immun. 112:1219-1239 (1974)

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med K.U. Benner für die jederzeit gewährte Unterstützung und die großartige Betreuung während der Anfertigung der Disseration.

Desweiteren möchte ich Herrn Professor Dr. med P. Böck, Institut für Mikromorphologie und Elektronenmikroskopie der Medizinischen Fakultät Wien, sowie Herrn Dr. rer. nat. U. Heinzmann, Abt. für Nuklearbiologie der Ges. für Strahlen- und Umweltforschung mbH München, für die stets freundlichen Ratschläge bei Problemen der Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie danken.

Lebenslauf

20.1.1955	geboren in Essen als Sohn des Bankangestellten Wilhelm Geeren und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Budde
1961 - 1965	Besuch der Volksschule in Essen
1965 - 1973	Besuch des städtischen neusprachlichen Gymnasiums Essen-Werden
14.5.1973	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
1973 - 1976	Offizier auf Zeit bei der Bundeswehr
1977 - 1983	Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
25.4.1983	Ablegung der Ärztlichen Prüfung und Erwerb der Approbation als Arzt
1.6.1983	vollbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft an der Anat. Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München